Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Selenverbindungen auf das Proteom von murinem Kolongewebe mittels 2D-Gelelektrophorese

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt
von Frau Jette Rahn
geb. am 08.04.1988 in Weimar

Gutachterin/ Gutachter:

1. PD. Dr. Hans-Hinrich Kaatz, Institut für Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
2. Prof. Dr. Barbara Seliger, Institut für Medizinische Immunologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
3. Prof. Dr. Stefan Stevanović, Interfakultäres Institut für Zellbiologie (IFIZ), Universität Tübingen, Tübingen

Verteidigungstermin: 27.11.2019

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS IV

TABELLENVERZEICHNIS VII

ABBILDUNGSVERZEICHNIS VIII

1 EINLEITUNG 1

1.1 Selen, Selenverbindungen und Selenoproteine 1
1.1.1 Die Entdeckung von Selen als essentielles Spurenelement 1
1.1.2 Aufnahme und Metabolismus von Se-Verbindungen 1
1.1.3 Synthese und Formen von Selenoproteinen 3

1.2 Das Kolongewebe 6
1.2.1 Funktion und Aufbau mit Unterschieden zwischen Maus und Mensch 6
1.2.2 Die spezielle Rolle des Selenoproteins GPx2 im Darm 8

1.3 Das anti-oxidative System und Redox-Signalwege 9
1.3.1 Entstehung und Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies 9
1.3.2 Oxidative post-translationale Modifikationen und die Beeinflussung von Proteinfunktionen 11
1.3.2.1 Redox-Signalwege im Darm 13
1.3.3 Selen als Modulator der Redox-Regulation 13

1.4 Einfluss von Se bzw. Selenoproteinen auf die menschliche Gesundheit 14
1.4.1 Physiologischen Funktionen von Se 14
1.4.2 Einsatz von Se in der Krebsprävention und -therapie 16
1.4.3 GPx2 und Tumorerkrankungen im Kolon 17

1.5 2D-Gelelektrophorese zur Untersuchung des Proteoms 18
1.5.1 Gel-basierte Proteom-Untersuchungen nach Se-Supplementierung 19

2 ZIELSTELLUNG 20

3 MATERIAL UND METHODEN 22

3.1 Verwendete Chemikalien und Geräte im Überblick 22

3.2 Fütterungsversuche mit Mäusen 25
3.2.1 20-wöchiger Versuch mit C57BL/6j Mäusen 25
3.2.2 8-wöchiger Versuch mit GPx2 *knockout* (KO) Mäusen 26

3.3 Molekularbiologische Methoden 27
3.3.1 Isolierung von RNA 27
3.3.2 DNA-Verdau und cDNA Synthese 27
3.3.3 *Real-time* Polymerasekettenreaktion (qPCR) 28

3.4 Proteinchemische Methoden 31
3.4.1 Proteinextraktion für die Durchführung von Proteomanalysen 31
3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode 31
3.4.3 Analyse des Proteoms von murinem Kolongewebe mittels 2D-DIGE 32
3.4.3.1 Strategien zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen 32
3.4.3.1.1 Minimalmarkierung 32
3.4.3.1.2 Sättigungsmarkierung und Einsatz der 2D-Redox-DIGE zur Analyse des Redoxstatus von Proteinen 34
3.4.3.2 Probenansatz für präparative Gele zur MS-Analyse 37
3.4.3.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese 37
3.4.3.3.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF) im pH Bereich 3-10 37
3.4.3.3.1.1 IEF für die Ansätze der Minimalmarkierung und für die präparativen Ansätze 38
3.4.3.3.1.2 IEF für die Ansätze der Redox-DIGE 38
3.4.3.3.2 Äquilibrierung der IPG-Streifen 39
3.4.3.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) von 2D-Gelen 39
3.4.3.4 Gelfärbung mittels kolloidalem Coomassie Brillant Blau 40
3.4.3.5 Dokumentation und Auswertung der 2D-Gele 41
3.4.3.5.1 Dokumentation von Coomassie-Gelen 41
3.4.3.5.2 Dokumentation von 2D-DIGE Gelen 41
3.4.3.5.3 Gelanalyse 42
3.4.3.6 Proteinidentifizierung mittels *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) 42
3.4.3.6.1 Entfärbung, in-Gel-Verdau und Auftragen von Proteinspots für die MS-Analyse 43
3.4.3.6.2 Massenspektrometrische Analyse 44

3.5 Immunologische Methoden 45
3.5.1 Western Blot 45
3.5.1.1 SDS-PAGE von 1D-Gelen 45
3.5.1.2 Immunoblot-Analysen 46
3.5.2 Redox Blot-Analysen 48

3.6 Validierung relevanter Zielstrukturen mittels zellbiologischer Methoden 49
3.6.1 Kultivierung und Lagerung humaner Kolonkarzinom-Zelllinien 49
3.6.2 Proliferations- und Zellviabilitätbestimmung 50

3.7 Statistische Auswertung 51

4 ERGEBNISSE 52

4.1 Identifizierung neuer Se-regulierter Proteine mittels 2D-DIGE in murinem Kolongewebe 52
4.1.1 Validierung ausgewählter Proteinidentitäten 56
4.1.1.1 Murines Kolongewebe 56
4.1.1.2 Humane Kolonkarzinom-Zelllinien 58

4.2 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Se-Verbindungen auf den Redoxstatus von Proteinen 66
4.2.1 Implementierung eines neuen Redox-DIGE Ansatzes 66
4.2.2 Verschiedene Se-Verbindungen ändern den Redoxstatus diverser Proteine in murinem Kolongewebe 66
4.2.3 Validierung des Redoxstatus von PRDX6 71

4.3 Ein GPx2-KO und/ oder eine Selenit-Supplementierung beeinflusst das Proteom in murinem Kolongewebe 74
4.3.1 Validierung ausgewählter Zielstrukturen 77

5 DISKUSSION 79

5.1 Identifizierung neuer Se-regulierter Proteine im murinen Kolongewebe 79
5.1.1 Einfluss des GPx2 KO 82
5.1.2 Übertragbarkeit muriner Ergebnisse auf das humane System 84

5.2 Se und das Redox-System im murinen Kolongewebe 87
5.2.1 Veränderungen im Protein-Redoxstatus durch Se-Supplementierungen 88
5.2.1.1 Der Redoxstatus von Peroxiredoxin-6 89
5.2.2 Optimierung der Redox-DIGE Methode und weitere Methoden zur Detektion von oxPTMs 91

6 ZUSAMMENFASSUNG 94

7 AUSBLICK 96

8 LITERATURVERZEICHNIS 98

PUBLIKATIONSLISTE 112

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG 113

LEBENSLAUF 114

DANKSAGUNG 115

ANHANG 116

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2DE	2D-Gelelektrophorese
ACN	Acetonitril
ad	adäquat
AK	Antikörper
AN32B	*Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B*
ANXA2/ Anxa2	Annexin A2
AS	Aminosäure
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca^{2+}	Calcium
CaM	Calmodulin
CAT	Catalase
CinC™	*Cysteine interacting compound*
CLCA1	*Calcium-activated chloride channel regulator 1*
COF1/ Cfl1	Cofilin-1
Cys	Cystein
ddH_2O	bidestilliertes Wasser
DIGE	Differenz-Gelelektrophorese
di-M	direkte Markierung
DTT	Dithiothreitol
EGFR	*Epidermal growth factor receptor*
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GF	Gelfiltration
GO	*Gene Ontology*
GPX/ GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GRX	Glutaredoxin
GSH/GSSG	Glutathion/ oxidiertes GSH
GSNO	S-Nitrosoglutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
H_2Se	Hydrogenselenid
ho	hoch
HSP84	*Heat shock protein HSP 90-beta*
IEF	Isoelektrische Fokussierung
ind-M	indirekte Markierung
IPS	Interner Proteinstandard
KEAP1	*Kelch-like ECH-associated protein 1*
KO	*knockout*

KRK	Kolorektales Karzinom
LMNA	Prelamin A/C
M	Membran
MALDI-TOF-MS	*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*-Massenspektrometrie
Met	Methionin
Min	Minute
Mito	Mitochondrium
MO	Mikroorganismen
MW	Mittelwert
N	Nukleus
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NEM	*N*-Ethylmaleinimid
NQO1	NAD(P)H Dehydrogenase [quinone] 1
Nrf2	*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*
$O_2^{\cdot -}$	Superoxidanion
oxPTM	oxidative post-translationale Modifikation
P	Plasma
p53	*Cellular tumor antigen p53*
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
Perox	Peroxisom
PKM2	Pyruvatkinase M2
PMF	Peptidmassenfingerabdruck
PRDX	Peroxiredoxin
PTEN	*Phosphatase and Tensin homolog*
PTM	Post-translationale Modifikation
ROS	*reactive oxygen species*/ reaktive Sauerstoffspezies
RPL13a	Ribosomal Protein L13a
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Se	Selen
-Se	Se-Mangel
Sec	Selenocystein
SECIS	*Sec insertion sequence*
SELNOP	Selenopotein P
SEM	Standardfehler
SeMet	Selenomethionin
-SH	Sulfhydryl/ Thiol-Gruppe
SO^{-}	Sulfensäure
SO^{2-}	Sulfinsäure
SO^{3-}	Sulfonsäure

SRX	Sulfiredoxin
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	N, N, N´, N´-Tetramethylendiamin
TRX	Thioredoxin
TRXRD/ Txrnd	Thioredoxinreduktase
TTHY	Transthryretin
WT	Wildtyp
Z	Zytosol
β-ME	β-Mercaptoethanol

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1-1: Funktionen einzelner Selenoproteine im Säugetier. 5
Tabelle 3-1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.....22
Tabelle 3-2: Übersicht über die verwendeten Geräte. 24
Tabelle 3-3: Zusammensetzung der Versuchsdiäten. 26
Tabelle 3-4: Verwendete Primerpaare für die qPCR-Experimente. 29
Tabelle 3-5: Schritte der qPCR-Reaktion. 31
Tabelle 3-6: Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe für die Minimalmarkierung. 32
Tabelle 3-7: Exemplarische Übersicht eines 2D-DIGE-Markierungsansatzes. 33
Tabelle 3-8: Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe der 2D-Redox-DIGE-Markierung.....34
Tabelle 3-9: Markierungsansätze für die Redox-DIGE Analyse der Selenit-supplementierten Gruppen im murinen Kolongewebe. 36
Tabelle 3-10: Zusammensetzung der Gelmatrix für die SDS-PAGE von 2D-Gelen. 40
Tabelle 3-11: Verwendete Laser und Filter zur Dokumentation von 2D-DIGE Gelen. 41
Tabelle 3-12: Ablauf der automatisierten Entfärbung, Verdauung und des Aufbringen der Proteinspots auf die MALDI-Platte. 44
Tabelle 3-13: Zur Kalibrierung eingesetzte Peptide und deren [M+H]+ m/z Werte. 45
Tabelle 3-14: Zusammensetzung eines 1D-SDS-PAGE Geles. 46
Tabelle 3-15: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper. 47
Tabelle 3-16: Verwendete humane Kolonkarzinom-Zelllinien. 49
Tabelle 4-1: Eine Supplementierung mit verschiedenen Selenverbindungen beeinflusst das Proteom von murinem Kolongewebe. 53
Tabelle 4-2: Validierung ausgewählter differentiell exprimierter Proteine in murinem Kolongewebe via qPCR. 56
Tabelle 4-3: mRNA-Expression ausgewählter Gene in Kolonkarzinom-Zelllinien nach Se-Behandlung (24 h). 62
Tabelle 4-4: Se-Supplementierungen verändern den Redoxstatus von Proteinen in murinem Kolongewebe. 68
Tabelle 4-5: Veränderungen im murinen Kolonproteom durch einen GPx2 KO. 75
Tabelle 5-1: Vor- und Nachteile 2D-DIGE basierter Proteomuntersuchungen. 84
Tabelle 5-2: Methoden zur Detektion von oxPTMs. 92

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1: Strukturformeln anorganischer/ organischer Se-Verbindungen. 2
Abbildung 1-2: Einleitender Se-Metabolismus. 3
Abbildung 1-3: Aufbau der Kolonwand und des Kolonepithels. 7
Abbildung 1-4: Entstehung und Abbau von ROS. 10
Abbildung 1-5: Oxidative post-translationale Modifikationen (oxPTMs) an Cysteinen. 12
Abbildung 1-6: Die Rolle von Se im menschlichen Organismus. 15
Abbildung 1-7: U-Verteilung zwischen Se-Status und Krebsrisiko. 17
Abbildung 1-8: Ablauf der 2D-DIGE. 18
Abbildung 3-1: Schematischer Ablauf der Redox-DIGE-Markierung. 35
Abbildung 3-2: Schematische Darstellung des MALDI-TOF Massenspektrometers. 43
Abbildung 3-3. Strategie zur Validierung des Redoxstatus von PRDX6. 48
Abbildung 4-1: Differentiell exprimierte Proteine in murinem Kolongewebe nach Se-Supplementierung. 52
Abbildung 4-2: Klassifizierung differentiell durch Se-Supplementierung exprimierter Proteine im murinen Kolongewebe. 54
Abbildung 4-3: Interaktionsnetzwerk differentiell exprimierter Proteine im murinen Kolongewebe. 55
Abbildung 4-4: Validierung Se-regulierter Proteine im murinen Kolongewebe. 57
Abbildung 4-5: Einfluss von Se-Verbindungen auf die Zellviabilität und metabolische Aktivität humaner Kolonkarzinom-Zelllinien. 59
Abbildung 4-6: Unterschiedliches mRNA-Expressionsmuster anti-oxidativer Gene in humanen Kolonkarzinom-Zelllinien. 60
Abbildung 4-7: mRNA- und Proteinmenge ausgewählter Zielstrukturen in humanen Kolonkarzinom-Zelllinien. 61
Abbildung 4-8: Eine Se-Behandlung beeinflusst die Proteinmenge von COF1 in der Kolonkarzinom-Zelllinie Colo320. 64
Abbildung 4-9: Veränderte LMNA-Proteinmenge durch Selenat-Behandlung in HT-29-Zellen. 65
Abbildung 4-10: Identifizierte Redox-modifizierte Proteine nach Se-Supplementierung in murinen Kolongewebe. 67
Abbildung 4-11: Klassifizierung der Proteine mit verändertem Redoxstatus in murinem Kolongewebe. 69
Abbildung 4-12: Interaktionsnetzwerk und Heatmap redox-modifizierter Proteine. 70
Abbildung 4-13: Validierung des PRDX6 Redoxstatus. 72

Abbildung 4-14: mRNA- und Proteinmenge von PRDX6 in murinem Kolongewebe. 73
Abbildung 4-15: Ein GPx2 KO beeinflusst das Proteom von murinem Kolongewebe nach Se-Supplementierung. 74
Abbildung 4-16: Klassifizierung differentiell exprimierter Proteine im murinen Kolongewebe beeinflusst durch den GPx2 KO. 76
Abbildung 4-17: Einfluss des GPx2 KO auf die mRNA-Expression von Abhd14b und Lmna in murinem Kolongewebe.....78
Abbildung 5-1: Venn-Diagramm differentiell exprimierter Proteine. 82

1 EINLEITUNG

1.1 Selen, Selenverbindungen und Selenoproteine

1.1.1 Die Entdeckung von Selen als essentielles Spurenelement

Der Schwedische Chemiker Berzelius entdeckte 1817 Selen (Se) als Nebenprodukt der Schwefelsäuresynthese und gab dem Element den Namen Selen nach der Göttin des Mondes Selene [1]. Die biologischen Aktivitäten von Se sind vielfältig. Zuerst wurden dessen toxischen Eigenschaften entdeckt. Nach Beschreibung einer nekrotischen Hufkrankheit mit exzessiven Verlust der Mähnen- sowie Schweifhaare frei-grasender Pferde im Jahr 1856 [2], konnte in den 1930er Jahren Se als Hauptverursacher dieser Pflanzen-induzierten Neuropatien in grasenden Pferden und Kühen in den USA identifiziert werden [3]. Schließlich zeigte sich 1957 die Bedeutung von Se in der Ernährung auf. Ein Se-Supplementierung bewahrte an Vitamin E-Mangel leidende Tiere in verschiedenen Labor- und Nutztierversuchen vor Erkrankungen [4–6]. Als in den 1980er Jahren eine in Teilen von China auftretende endemische Herzerkrankung (Keshan-Krankheit) mit sehr geringen Se-Spiegeln im Blut in Verbindung gebracht wurde, konnte auch die ausdrückliche Relevanz von Se im menschlichen Organismus belegt werden [7,8]. Jedoch sind auch toxische Symptome von zu hohem Se-Spiegel (Selenose), wie z.B. Knoblauchgeruch, Haar- und Nagelverlust oder Störungen des Nervensystems, beschrieben [9]. Somit hat Se zwei Seiten: Zum einen ist es essentiell mit einer empfohlenen Aufnahme von 60-70 µg/ Tag [10] und zum anderen hat die *World Health Organization* (WHO) ein toxisches Limit von 800 µg/ Tag festgelegt [1]. Dies weist auf den relativ engen Bereich zwischen gesundheitserhaltenden und toxischen Se-Mengen hin und verdeutlicht die Bezeichnung als „essentielles Gift“, wie sie von Jukes [11] formuliert wurde.

1.1.2 Aufnahme und Metabolismus von Se-Verbindungen

Die Bioverfügbarkeit von Se wird über dessen chemische Verbindung beeinflusst, da nicht alle Se-Verbindungen über die gleichen Stoffwechselwege resorbiert und verarbeitet werden [12] (Abbildung 1-1). Die Resorption der verschiedenen Se-Formen findet meist im unteren Teil des Dünndarms statt [13]. Anorganische Se-Verbindungen wie Natrium-Selenit oder –Selenat (Selenit, Selenat), beides Bestandteile von Se-Supplementen, werden entweder über einfache Diffusion (Selenit) oder über Membranprotein-vermittelte Diffusion (Selenat) aufgenommen [14,15]. Organische Se-Verbindungen, insbesondere Se-beinhaltende Aminosäuren (AS) wie Selenomethionin (SeMet) oder Selenocystein (Sec) stellen die hauptsächlichen Se-Formen in der menschlichen bzw. tierischen Nahrung dar.

Während SeMet in Pflanzen synthetisiert und in deren Proteine an Methioninpositionen eingebaut wird, ist Sec die Se-Form in tierischen Selenoproteinen und wird über den Verzehr tierischer Produkte aufgenommen [16]. Nach intestinalem Verdau der Proteine werden die entsprechenden Produkte durch aktive Transport-prozesse aufgenommen [13,17,18].

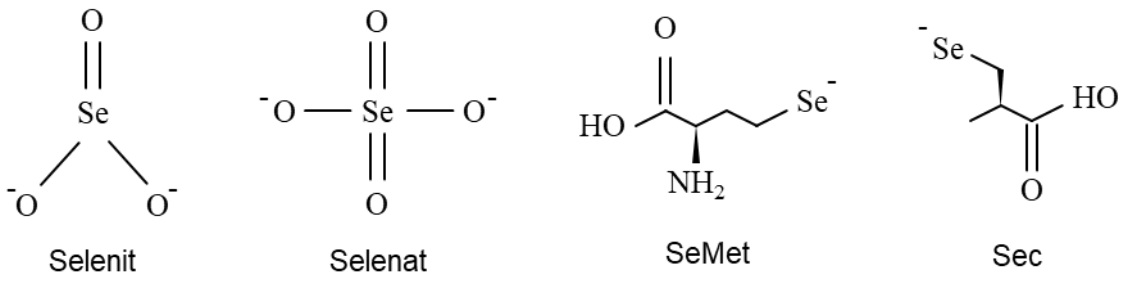

Abbildung 1-1: Strukturformeln anorganischer/ organischer Se-Verbindungen.

Darstellung der Strukturformeln anorganischer (Selenit/ Selenat) und organischer (Selenomethionin (SeMet)/ Selenocystein (Sec)) Se-Verbindungen.

Diffusionsanalysen in der Zellkultur zeigten für SeMet eine höhere Effizienz im Vergleich zu anorganische Se-Verbindungen in Caco-2 Zellen auf [19,20]. Weiterhin wird postuliert, dass methylierte Se-Verbindungen wie SeMet durch den limitierenden Schritt der Demethylierung weniger für die Selenoproteinsynthese verfügbar sind. Somit könnte SeMet zwar besser resorbiert, aber weniger in Selenoproteine eingebaut werden [21,22], wodurch die Netto-Bioverfügbarkeit ähnlich der anorganischen Se-Verbindungen ist [19]. Durch den bekannten nicht-regulierten sowie unspezifischen Einbau von SeMet in Proteinen anstatt von Met steht das Se aus SeMet ebenfalls nicht mehr für die Selenoproteinsynthese zu Verfügung [23].

Nach Aufnahme im Gastrointestinaltrakt (GIT) werden die verschiedenen Se-Formen zur Leber, dem zentralen Organ des Se-Metabolismus transportiert [24]. Anorganische Se-Verbindungen werden unter Verbrauch von Reduktionsäquivalenten wie Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) und Glutathion (GSH) zum erforderlichen Intermediat Hydrogenselenid (H_2Se) reduziert [25] (Abbildung 1-2). Im Gegensatz dazu wird Se aus SeMet infolge von katabolen Prozessen, wie dem Met-Kreislauf und dem Trans-Selenierungsweg (analog zum Trans-Sulfierungsweg [26]), über Sec zu H_2Se umgewandelt [16,17]. Die Selenocysteinlyase (β-Lyase/ Sec-Lyase) unterscheidet zwischen Sec und dem Schwefelanalogon Cystein (Cys). Dies stellt den Einstiegspunkt in den spezifisch regulierten Se-Metabolismus dar [27]. SeMet könnte ferner direkt durch die γ-Lyase methyliert und nach einem De-Methylierungsschritt zu H_2Se umgewandelt werden [24] (Abbildung 1-2).

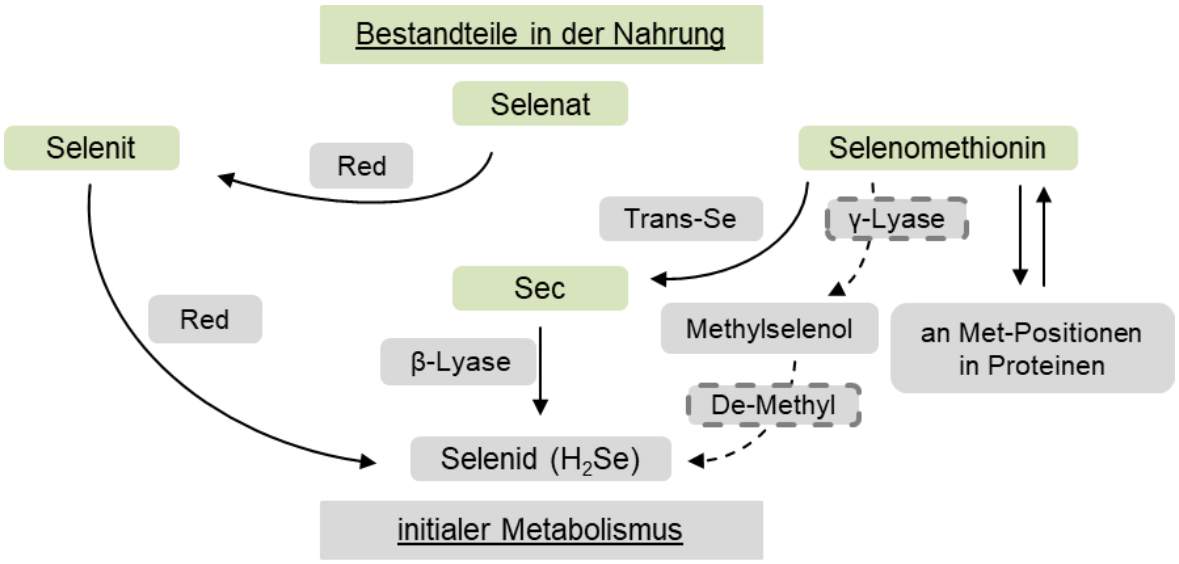

Abbildung 1-2: Einleitender Se-Metabolismus.

Übersicht über den einleitenden Se-Metabolismus von hauptsächlich in der Nahrung enthaltener Se-Verbindungen. Während Selenat/ Selenit zum erforderlichen Intermediat Hydrogenselenid (H_2Se) reduziert werden, wird Selenomethionin (SeMet) über katabole Prozesse zu H_2Se umgewandelt. Zusätzlich kann SeMet unspezifisch anstelle von Met in Proteine eingebaut werden. De-Methyl, De-Methylierung; Trans-Se, Trans-Selenierung; Red, Reduktion.

Der größte Anteil des aufgenommenen Se wird von der Leber der Körperzirkulation als Bestandteil des Plasmaproteins Selenoprotein P (SELENOP), dem hauptsächlichen Se-Transporter zu den peripheren Geweben zugeführt [28]. Überschüssiges Se wird ausgehend vom H_2Se durch aufeinander folgende Methylierungsschritte zu Dimethylselenid (DMSe), welches über die Lunge ausgeschieden wird und Selenozucker sowie Trimethylselenid (TMSe) mit Ausscheidung über den Urin, umgewandelt [13].

1.1.3 Synthese und Formen von Selenoproteinen

Die Synthese von Selenoproteinen beinhaltet Prozesse, welche sich von der normalen Proteinsynthese unterscheiden. Der Einbau von Sec wird durch das UGA Codon, das normalerweise als Stopcodon das Ende des Leserahmens für die Proteinbiosynthese darstellt codiert [29]. Von besonderer Bedeutung für die Selenoproteinsynthese ist die *selenocysteine inserting sequence* (SECIS), eine Haarnadelstruktur in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der mRNA aller eukaryotischer Selenoproteine. Das SECIS-Element dient als Bindungsstelle für RNA-bindende Proteine, wie z.B. dem *selenocysteine-tRNA specific eukaryotic elongation factor* (EEFSec) und dem *SECIS-binding protein* (SPH2S) [30,31]. Die spezifische Sec-tRNA$^{[ser]sec}$ ist ein weiterer wichtiger Bestandteil der Selenoproteinsynthese und stellt den Sec-Donor während der Translation dar. Sec wird im Gegensatz zu anderen AS direkt an seiner tRNA synthetisiert [16]. Als Se-

Quelle für die Sec-tRNA$^{[ser]sec}$ dient H_2Se, welches von der Selenophosphatsynthetase-2 (SPS2) unter dem Verbrauch von ATP zu Monoselenphosphat umgewandelt wird. Schließlich interagiert EEFSec zur Rekrutierung von Sec-tRNA$^{[ser]sec}$ mit SBP2 und vermittelt den Einbau von Sec in die wachsende AS-Kette [32]. Neben den bereits genannten SECIS-bindenden Proteinen konnten noch das *ribosomal protein L30* (L30), ein essentieller Bestandteil des Ribosoms und der UGA Re-Codierung [33], der *eukaryotic initiation factor 4a isoform 3* (eIF4a3), welcher eine Schlüsselrolle bezüglich der Regulation der Selenoproteinsynthese nach dem Hierarchieprinzip spielt [34] und Nucleolin als möglicher „Positiv"-Regulator der Selenoprotein-Translation [35] beschrieben werden.

Sec, die 21ste proteinogene AS ist nach der Selenoproteinsynthese im katalytischen Zentrum der Selenoproteine lokalisiert und nimmt eine Hauptrolle in der Funktion dieser Oxidoreduktasen ein. Mit Ausnahme von SELNOP, welches 10 Sec in der AS-Kette beinhaltet und als Se-Transportprotein gilt, tragen alle Selenoproteine ein Sec [36]. Zurzeit sind 25 Gene bekannt, welche für Selenoproteine im Menschen kodieren, während es in Nagetieren 24 Gene sind [37]. Zusätzlich wurden Spleißvarianten sowie post-translational modifizierte Versionen der Genprodukte sowohl identifiziert als auch charakterisiert, womit sich die Anzahl funktioneller Selenoproteinen sowie das Spektrum an biologischen Funktionen der individuellen Selenoproteine erhöht [38]. Neben anti-oxidativen Funktionen besitzen Selenoproteine noch weitere spezifische Eigenschaften, wie z.B. Reduktion oxidierter Proteine und Membranen, Regulation der Apoptose und Regulation der Funktion von Schilddrüsenhormonen, Immunmodulation sowie Proteinfaltung (Tabelle 1-1). Zu bemerken ist in diesem Zusammenhang auch, dass von manchen Selenoproteinen die Funktion noch unbekannt ist.

Das erste Protein für das Se als ein funktioneller Enzymbestandteil identifiziert wurde, war 1973 die GPx [39]. Bis heute sind acht Formen dieser anti-oxidativ wirksamen Enzyme bekannt, wobei GPx5, GPx7 und GPx8 im Menschen und zusätzlich GPx6 in Nagetieren (Maus, Ratte) ein Cys statt einem Sec tragen. Die Hauptfunktion der GPx-Familie ist die Neutralisation von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sowie organischen Hydroperoxiden sowohl intra- als auch extrazellulär unter Verwendung von GSH als Reduktionsmittel [40].

Tabelle 1-1: Funktionen einzelner Selenoproteine im Säugetier.

Selenoprotein (Genname)	Lokalisation	Funktion
Glutathionperoxidasen		
GPX1	Z, Mito	GSH-abh. Reduktion von Hydroperoxiden
GPX2	Z	
GPX3	P	
GPX6*	Z	
GPX4	Z, N, Mito	GSH-abh. Reduktion von Phospholipid-Hydroperoxiden
Thioredoxinreduktasen		Regulation von Immunzellsignalwegen; Apoptoseinhibierung
TXNRD1	Z	Reduktion von zytosolischen Thioredoxin
TXNRD2	Z	Testis-spezifisch, katalysiert verschiedene Reaktionen spezifisch für Thioredoxin und Glutaredoxin
TXNRD3	Z, Mito	Reduktion von mitochondrialen Thioredoxin und Glutaredoxin 2
Iodothyronin Deiodinasen		
DIO1	PM	Regulierung der Schilddrüsenhormon-aktivität durch reduktive Dejodierung
DIO2	ER	
DIO3	PM	
15 kDa Selenoprotein (SELENOF)	ER	Proteinfaltung im ER
Selenophosphat Synthetase (SEPH2S)	Z	Synthese von Selenophosphat, Selenoproteinsynthese
Selenoprotein H (SELENOH)	N	Regulierung der GSH-Synthese und von Phase-II Detoxifikationsprozesse
Selenoprotein I (SELENOI)	M	Unbekannte Funktion
Selenoprotein K (SELENOK)	ER-M	Modulierung des Calcium-Stoffwechsels, Bestandteil der ERAD
Selenoprotein M (SELENOM)	ER	Neuroprotektiv
Selenoprotein N (SELENON)	ER-M	Involviert in Ca^{2+}- Homöostase
Selenoprotein O (SELENOO)	Mito	Unbekannte Funktion
Selenoprotein P (SELENOP)	P	Se-Transport zu peripheren Organen
Methioninsulfoxidreduktase (MSRB1)	Z	Reduktion oxidierter Methioninreste
Selenoprotein S (SELENOS)	ER-M	Bestandteil der ERAD; anti-apoptotische Funktion
Selenoprotein T (SELENOT)	ER	Regulation der β-Zellfunktion, Glukosehomöostase
Selenoprotein V (SELENOV)	Z	Unbekannte Funktion
Selenoprotein W (SELENOW)	Z	Involviert in Zell-Zyklus-Progression und Zellproliferation

Modifiziert nach [13,29,41–44]. *Sec ersetzt durch Cys im Nagetier (Maus, Ratte) [37]. Z, Zytosol; P, Plasma; Mito, Mitochondrium; N, Nukleus; ER, Endoplasmatisches Retikulum; M, Membran; ERAD, *Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*.

Ein interessanter Aspekt hinsichtlich der GPx-Familie ist die Entdeckung der „Hierarchie der Selenoproteine“. Diese besagt, dass Selenoproteine nicht im gleichen Maße abhängig vom verfügbaren Se exprimiert werden. Manche Selenoproteine werden unter Se-Mangel-Verhältnissen in geringeren Mengen synthetisiert während von anderen die Proteinmenge stabil bleibt [40]. Dementsprechend sind die Selenoproteine, die unter Se-Mangel-Konditionen vermindert exprimiert werden in der Hierarchie geringer eingestuft. So zeigte sich, dass unter Se-Mangel-Verhältnissen die Enzymaktivität der GPx4 in Leber, Niere und Herz von Ratten aufrechterhalten wurde, während sich die Enzymaktivität der GPx1 stark verminderte [45]. Ebenfalls hoch in der Selenoprotein Hierarchie eingestuft wurde die im intestinalen Epithel vorkommende GPx2. Es stellte sich heraus, dass sowohl GPx2 mRNA- als auch Proteinmengen unter Se-Mangel-Konditionen im Vergleich zur „klassischen“ cGPx (GPx1) stabil blieben [46], was auf eine Regulation über mRNA-Degradation zurückgeführt wird [40]. Somit lässt sich folgende Hierarchie für die GPx-Familie ableiten: GPx2 > GPx4 > GPx3 > GPx1 [46]. Eine komplette Einstufung aller Selenoproteine ist bisher jedoch nicht bekannt.

1.2 Das Kolongewebe

1.2.1 Funktion und Aufbau mit Unterschieden zwischen Maus und Mensch

Da Mäuse und Menschen hinsichtlich ihrer Physiologie und anatomischen Strukturen nahezu ähnlich sind werden Mausmodelle häufig zur experimentellen Untersuchung in biomedizinischen Studien eingesetzt. Insbesondere der GIT beider Spezies ist anatomisch vergleichbar, wobei der Dickdarm in Blinddarm, Kolon und Rektum unterteilt wird [47,48]. In der Maus ist er bis zu 14 cm sowie im Menschen ungefähr 105 cm lang [49]. Die Hauptaufgabe stellt die Rückresorption von Wasser und Salzen, welche mit den Verdauungssäften in den Darm gelangen, dar. Abweichend von der Dünndarmschleimhaut weist die Dickdarmschleimhaut durch das Fehlen von Zotten eine geringere Oberflächenvergrößerung auf, welche lediglich durch tiefe Einsenkungen (Krypten) vergrößert wird [47]. Im Vergleich zum Dickdarm des Menschen, welcher sich in Aussackungen gliedert (*Haustra coli*), ist der der Maus glatt ohne derartige Aufteilungen. Zusätzlich werden in der Maus unverdauliche Nahrungsbestandteile im Blinddarm durch Mikroorganismen (MO) fermentiert, wohingegen dies im Menschen im Kolon erfolgt und der Blinddarm verkümmert ist [48].

Die Kolonwand wird in unterschiedliche Bereiche gegliedert. Von außen nach innen liegen die Schichten *Tunica serosa*, *Tunica muscularis*, *Tela submucosa* und *Tunica mucosa*, welche zum Darmlumen hin die Darmschleimhaut bildet (Abbildung 1-3 A). Die *Tunica*

mucosa wird in die *Lamina muscularis mucosae*, eine Abgrenzung zur *Tela submucosa* sowie in die *Lamina propria mucosae*, eine Schicht aus Bindegewebe in der Blut- und Lymphgefäße als auch lymphatische Zellen lokalisiert sind und abschließend in die *Lamina epithelialis mucosae*, einem einschichtigen Epithel mit direkten Kontakt zum Nahrungsbrei sowie der im Darmlumen vorkommenden MO, unterteilt [47].

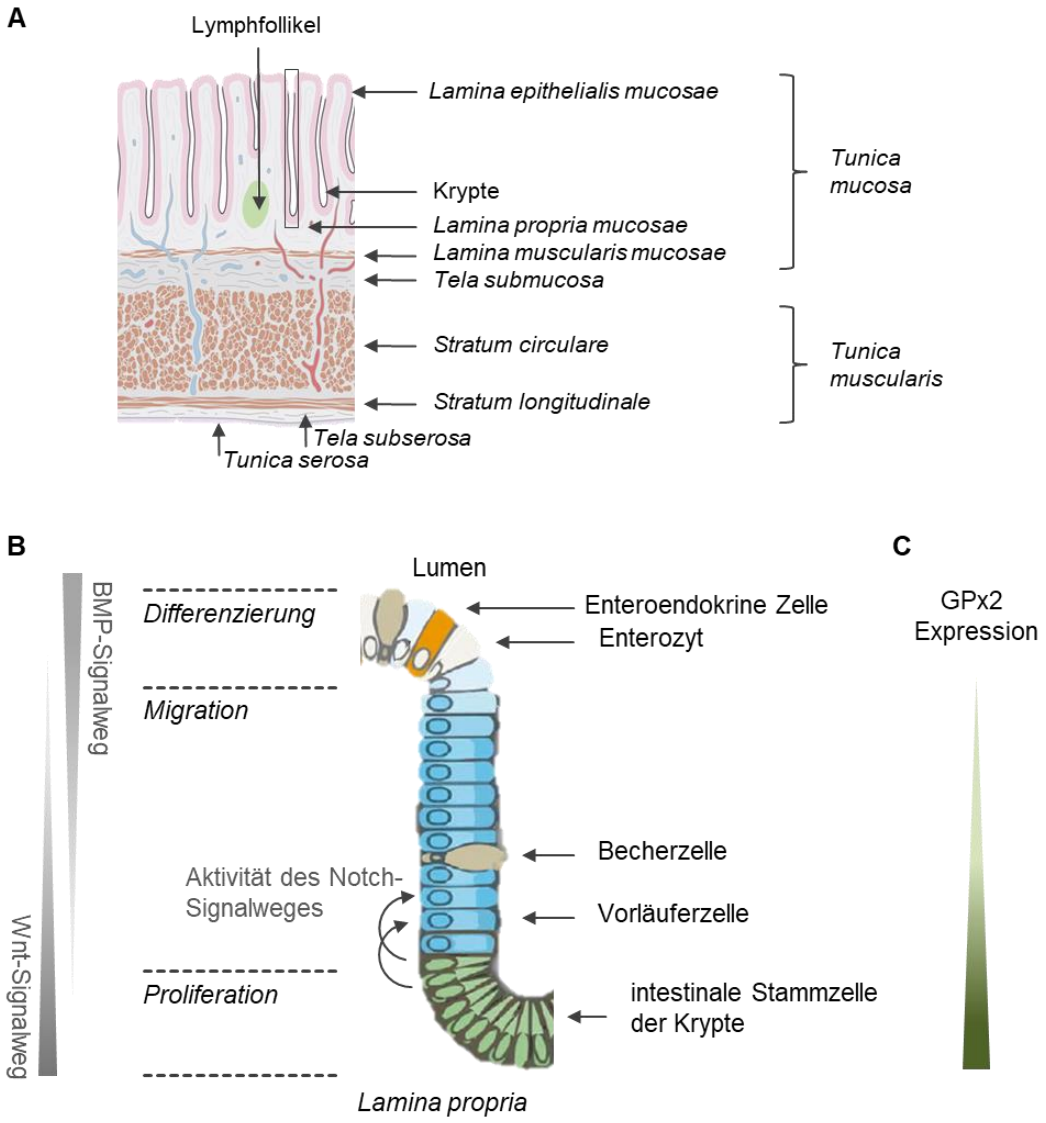

Abbildung 1-3: Aufbau der Kolonwand und des Kolonepithels.

(A) Die Wand des Kolons wird aus den Schichten *Tunica Serosa, Tunica muscalaris, Tela submucosa* und *Tunica mucosa* gebildet, welche sich in weitere Unterschichten aufgliedern (Details siehe Text). Modifiziert nach [50]. (B) Die Basis der Kolonkrypte liegt der Lamina Propria auf und wird aus intestinalen Stammzellen gebildet. Diese teilen sich während der Selbsterneurung des Epithels in Vorläuferzellen, aus denen sich die differenzierten Zelltypen, wie Becherzellen, Enterozyten sowie enteroendokrine Zellen bilden, welche dabei zum Lumen hin migrieren. Proliferation, Migration und Differenzierung werden durch die Aktivität der Wnt- und Notch-Signalwege sowie der *bone morphogenic proteins* (BMP) kontrolliert. Modifiziert nach [51]. Die Expression des Selenoproteins GPx2 ist am höchsten in der Kryptenbasis und nimmt zum Lumen hin ab [52] (C).

Ferner befinden sich in der Kolonwand Teile des darmassoziierten Immunsystems wie Lymphfollikel sowie Immunzellen in der Mukosa [53]. Das Kolonepithel erneuert sich alle 4-5 Tage [54]. Die Basis einer Krypte liegt der *Lamina Propria* auf und wird aus Stammzellen zusammengesetzt, aus denen sich die zwei hauptsächlich vorkommenden Zelltypen Enterozyten und Becherzellen sowie enteroendokrine Zellen und Tuftzellen differenzieren [55] (Abbildung 1-3 B).

Die Prozesse der Proliferation und Differenzierung der intestinalen Zellen werden durch verschiedene Signalwege reguliert. Der Wnt-Signalweg treibt hierbei die Proliferation von Stamm- und Vorläuferzellen an wobei dessen Aktivität einem Gradienten folgt, mit einem Maximum am Kryptengrund. Die Differenzierung der Zellen in entweder Enterozyten oder Becherzellen wird vom Notch-Signalweg und *bone morphogenic proteins* (BMP) kontrolliert, letztere sind vor allem im Bereich des Lumens lokalisiert und stellen Negativ-Regulatoren der Proliferation dar [51].

Auch auf zellulärer Ebene gibt es Unterschiede zwischen den beiden Spezies. So sind beispielsweise Mukus-produzierende (intestinaler Schleim) Becherzellen in der Maus in den intestinalen Krypten des proximalen Kolons reichlich vorhanden wohingegen im distalen Kolon und Rektum deren Anzahl in der Basis der Krypten abnimmt. Dagegen sind Becherzellen beim Menschen von Blinddarm bis zum Rektum gleichmäßig vorhanden. Insgesamt ist der GIT von Säugetieren stark konserviert und die Hauptunterschiede zwischen den Spezies werden wahrscheinlich durch die Nahrung verursacht [48].

1.2.2 Die spezielle Rolle des Selenoproteins GPx2 im Darm

Die GPx2 wird hauptsächlich im GIT, einschließlich dem Plattenepithel der Speiseröhre, gesunder Organismen exprimiert und wurde im Menschen auch in der Leber detektiert [52]. Die zuvor beschriebene Hierarchie der Selenoproteine weist auf eine Umverteilung von Se unter Se-restriktiven Verhältnissen zur GPx2 hin. Dies betont deren entscheidende Rolle als möglicher erster Schutz gegen Hydroperoxide aus der Nahrung [56]. Zusätzlich ist die GPx2 ein Zielgen des *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* (Nrf2), einem Transkriptionsfaktor, der eine entscheidende Rolle in der anti-oxidativen Abwehr einnimmt [57].

Jedoch könnte eine Hydroperoxid-Reduktion nicht die Hauptfunktion der GPx2 darstellen, da die höchste Konzentration an GPx2-Protein in der intestinalen Kryptenbasis von humanem Intestinalgewebe mit allmählicher Abnahme zum Kolonlumen bzw. zu den Dünndarmzotten hin gefunden wurde [52] (Abbildung 1-3 C). Durch Experimente mit GPx2 *knockout* (KO) Mäusen stellte sich die spezifische Rolle der GPx2 heraus. Dabei zeigte sich

in GPx2-KO Mäusen eine erhöhte Zahl an apoptotischen Zellen in der Kolonkryptenbasis im Vergleich zu Wildtyp (WT) Mäusen. Diese vermehrte Apoptose wurde nicht durch eine kompensatorisch auftretende erhöhte GPx1 Expression komplett unterbunden [58], womit die Funktion der GPx2 im Darm nicht durch ein anderes Selenoprotein übernommen werden kann. Die Lage der GPx2 in der intestinalen Kryptenbasis fällt zusammen mit der Lokalisation von proliferierenden Stammzellen, deren Wachstum bzw. Differenzierung über den Wnt-Signalweg reguliert werden [59]. Die Identifizierung der GPx2 als Zielgen des Wnt-Weges [60,61] zusätzlich zur Ko-Lokalisation mit intestinalen Stammzellen weist auf eine wesentliche Rolle der GPx2 während der kontinuierlichen Selbsterneuerung des intestinalen Epithels und somit der mukosalen Homöostase hin [40].

1.3 Das anti-oxidative System und Redox-Signalwege

1.3.1 Entstehung und Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies

Als Nebenprodukt des physiologischen zellulären Metabolismus entstehen reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS), die in zwei Gruppen eingeteilt werden können: Zum einen freie Radikale wie das Superoxidanion ($O_2^{\cdot -}$) und das Hydroxylradikal ($^{\cdot}OH$) und zum anderen die nicht-radikalen Moleküle H_2O_2, singulärer Sauerstoff ($^1O_2$), hypochlorige Säure (HOCl) und Ozon (O_3) [62]. Alle ROS-Moleküle weisen spezifische chemischen Eigenschaften auf, welche zu einer unterschiedlichen Reaktivität gegenüber Zielstrukturen führen [63]. Die primäre Quelle für endogen gebildetes $O_2^{\cdot -}$ sind die Reaktionen der Komplexe I und III der mitochondrialen Atmungskette [64–66]. Ferner wird $O_2^{\cdot -}$ auch im ER, im Peroxisom, im Zellkern sowie durch enzymatische Reaktionen der NADPH-Oxidasen (NOX), Xanthindehydrogenase (XDH) oder der entkoppelten endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) gebildet [67–69] (Abbildung 1-4).

Aus enzymatischer Sicht katalysieren Superoxiddismutasen (SOD) $O_2^{\cdot -}$ zu H_2O_2, welches nachfolgend von der Katalase (CAT), den GPx oder PRDX in H_2O konvertiert oder durch die Fenton-Reaktion zum $^{\cdot}OH$ reduziert wird [63,70]. Die durch die enzymatischen Aktivitäten von GPx und PRDX oxidierten Reduktionsmittel GSSG und Trx^{ox} werden unter Verbrauch von NADPH/H+ durch die Glutathionreduktase (GR) bzw. TXNRD regeneriert (Abbildung 1-4). Veränderungen im GSH/ GSSG-Verhältnis sind folglich mit einer wesentlichen Feinjustierung der Signaltransduktion gekoppelt [71]. Neben GSH können ROS durch weitere kleine anti-oxidativ wirkende Moleküle wie Vitamin A und C sowie Harnsäure direkt ROS abgefangen werden [72].

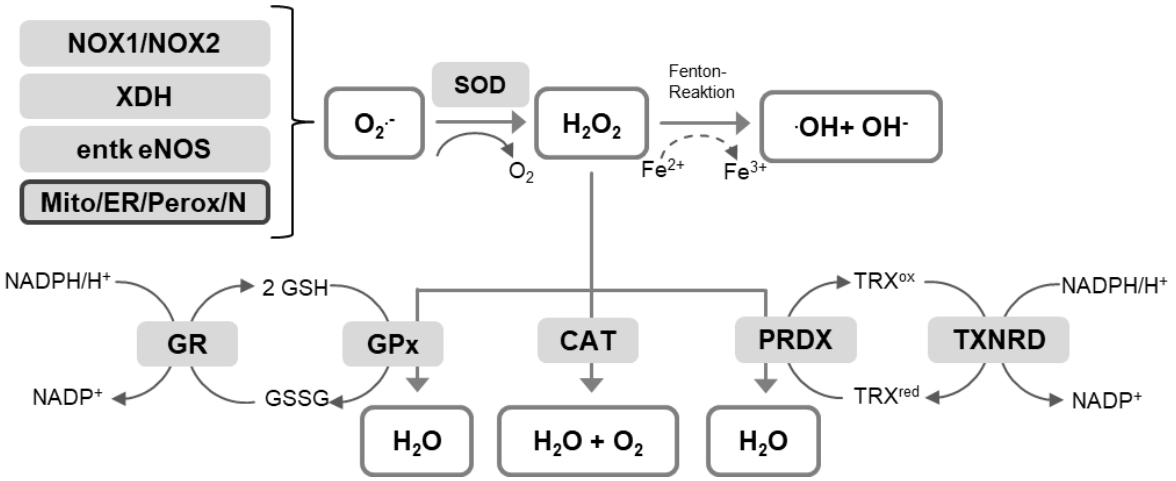

Abbildung 1-4: Entstehung und Abbau von ROS.

Im Organismus wird das $O_2^{\cdot-}$ sowohl in Zellorganellen als auch enzymatisch produziert, durch die Superoxiddismutasen (SOD) zu H_2O_2 umgewandelt und anschließend durch Glutathionperoxidasen (GPx), Katalase (CAT) und Peroxiredoxinen (PRDX) zu H_2O und O_2 konvertiert. Das durch die GPx abhängige Reaktion oxidierte Glutathion (GSSG) wird unter NADPH-Verbrauch durch die Glutathionreduktase (GR) reduziert und durch die Reaktion der PRDX oxidiertes Thioredoxin (TRX^{ox}) wird unter NADPH-Verbrauch von den Thioredoxinreduktasen (TXNRD) reduziert. ER, Endoplasmatisches Retikulum; entk eNOS, entkoppelte endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase; Mito, Mitochondrium; N, Nukleus; NOX, NADPH-Oxidasen; Perox, Peroxisom; XDH, Xanthindehydrogenase. Modifiziert nach [67].

Im anti-oxidativen System stellen sowohl die GPx als auch die TXNRD Selenoproteine dar, welche ein Sec im katalytischen Zentrum tragen. Die Selenyl-Gruppe (-SeH) des Sec besitzt im Vergleich zur Sulfhydryl-Gruppe (-SH) von Cys eine höhere Reaktivität [73]. Dies könnte durch die Unterschiede hinsichtlich der pKa-Werte von Sec mit 5,2 und Cys mit 8,3 erklärt werden, wodurch Sec unter physiologischem pH-Bedingungen (ca. pH 7,0) als Selenolat ($-Se^-$) existiert während die Sulfhydryl-Gruppe unverändert bleibt. Die Selenyl-Gruppe ist somit sensitiver gegenüber Oxidation als die Sulfhydryl-Gruppe [19] und es wird postuliert, dass Se an Stelle von Schwefel aufgrund seiner um mehrere Größenordnungen schnelleren Kinetik in Redoxprozessen bevorzugt wird [74]. Se ist sowohl ein gutes Elektrophil als auch Nukleophil. Durch diese Eigenschaft kann Se leicht zwischen einem reduzierten und oxidierten Status wechseln ohne dabei permanent oxidiert zu sein, was mit einer Inaktivierung der Selenoproteinfunktion einherginge [75]. Diese Resistenz gegenüber Inaktivierung von Selenoenzymen durch Oxidation im Gegensatz zu Cys-Enzymen wird auch als das „Selen Paradox“ bezeichnet [76].

1.3.2 Oxidative post-translationale Modifikationen und die Beeinflussung von Proteinfunktionen

Unter physiologischen Bedingungen sind ROS an Prozessen wie der Zellproliferation, -migration und –differenzierung sowie der Kontrolle der Zell- und Gewebehomöostase beteiligt [68,72]. Kommt es zu einer übermäßigen Produktion von ROS, welches das anti-oxidative zelluläre Abwehrsystem nicht kompensieren kann, entsteht oxidativer Stress. Dieser resultiert in einer direkten oder indirekten ROS-vermittelten Schädigung von Lipiden, Proteinen sowie der DNA und wurde mit verschiedenen pathologischen Veränderungen wie Krebsentstehung, neurologischer Degeneration, Atherosklerose, Diabetes und dem Altern in Verbindung gebracht [77–80]. Jedoch wird derzeit auch die Rolle von ROS, im speziellen von H_2O_2 als Mediatoren der intrazellulären Signaltransduktion und somit der Regulation verschiedener physiologischer bzw. biologischer Prozesse in den Fokus genommen [63,66].

Die spezifischen Effekte des Redox-Signalings werden maßgeblich über kovalente Modifikationen von Cys-Seitenketten redox-sensitiver Proteine vermittelt. Diese oxidativen post-translationalen Modifikationen (oxPTM) der Cys stellen einen wichtigen Mechanismus dar, der Einfluss auf Struktur als auch Funktion eines Proteins haben kann [81]. Die einzigartigen Eigenschaften der Cys ermöglichen die Bildung unterschiedlicher oxPTMs (Abbildung 1-5) mit verschiedenen regulatorischen Effekten [82].

Durch Reaktion mit H_2O_2 erfolgt eine Oxidierung reaktiver Cys-Seitenketten zur Sulfensäure (SO^-), welche instabil ist und weiter zur Sulfinsäure (SO_2^-) oxidiert. Unter höheren oxidativen Stress-Bedingungen wird die irreversible oxPTM Sulfonsäure (SO_3^-) generiert [66]. SO_2^- galt ebenfalls als irreversible oxPTM an Cys, allerdings konnte eine Reduktion der SO_2^- an PRDX durch Sulfiredoxin (SRX) gezeigt werden [83–85]. Reaktionen mit weiteren freien Thiolen führen sowohl ausgehend vom Thiolatanion als auch der SO^- zur Ausbildung inter- bzw. intramolekularer Disulfidbrücken, die in der Proteinfaltung als auch Proteinkomplexbildung involviert sind. Zusätzlich können Disulfidbrücken dynamisch sein, was die Struktur und Funktion eines Proteins beeinflussen kann [81,86]. Das Thiolatanion kann durch Reaktion mit S-Nitrosoglutathion (GSNO) und mit oxidierten Glutathion (GSSG) glutathionyliert werden. Die Aktivitäten von Thioredoxin (TRX) und Glutaredoxin (GRX) ermöglichen die Reduktion reversibler oxPTMs [70]. Insgesamt wurden bisher 18 verschiedene biologisch auftretende Cys-Modifikationen beschrieben wodurch die Bedeutung von oxPTMs innerhalb der Zelle verdeutlicht wird [87].

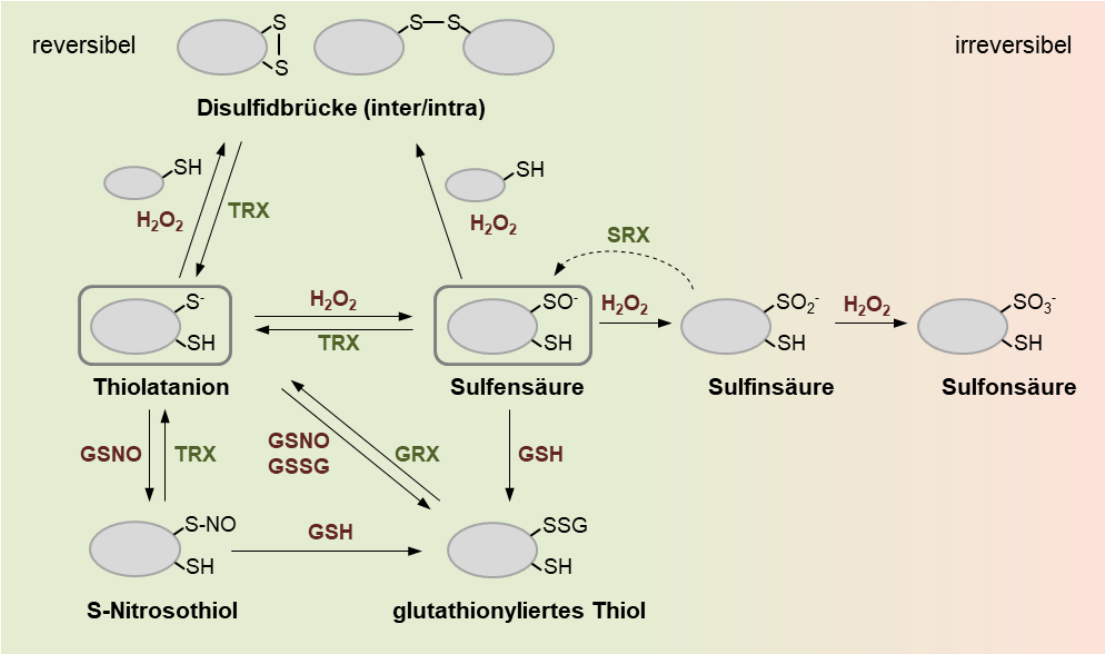

Abbildung 1-5: Oxidative post-translationale Modifikationen (oxPTMs) an Cysteinen.

Redox-sensitive Cys-Reste existieren unter physiologischen Bedingungen als Thiolatanion, welches leicht von H_2O_2 zu Sulfensäure (SO^-) oxidiert wird. Hohe H_2O_2 Konzentrationen führen zur weiteren Oxidation der SO^- zu Sulfin- (SO_2^-) und Sulfonsäure (SO_3^-). Während letztere irreversibel ist, kann eine SO_2^- speziell an Peroxiredoxinen (PRDX) durch Sulfiredoxin (SRX) zurück zur SO^- konvertiert werden. Weitere kleine Moleküle führen zu reversiblen Modifikationen wie zu S-Nitrosothiolen oder glutathionylierten Thiolen. Sowohl das Thiolatanion als auch die SO^- bilden mit einem weiteren Thiol inter- oder intramolekulare Disulfidbrücken. Durch die enzymatische Aktivität von Thioredoxin (TRX) und Glutaredoxin (GRX) werden die oxidierten Cys-Reste wieder reduziert. Modifiziert nach [66,70,81,88].

Für zahlreiche Proteine, inklusive verschiedener Transkriptionsfaktoren, Rezeptoren, Kinasen oder Phosphatasen wurden oxPTMs beschrieben, welche deren Funktion entweder aktivieren oder auch inaktivieren können (verschiedene Beispiele in [66,81,89,90]). Jedoch wird das Redox-Signaling noch häufig ignoriert obwohl therapeutische Ansätze etwa in der Tumorbehandlung auch das zelluläre Redox-Signaling ansprechen [91]. Ein essentielles Enzym der Glykolyse ist z.B. die Pyruvatkinase M2 (PKM2), die im Vergleich zu normalem Gewebe viele Tumorzellen erhöht exprimieren. Durch eine Oxidation des Cys^{358} wird die Aktivität der PKM2 und folglich die Glykolyse inhibiert. Als Konsequenz wird Glukose in Tumorzellen gesteigert über den Pentose-Phosphat-Weg abgebaut, wodurch vermehrt Reduktionsäquivalenten (NADPH) gebildet werden. Diese sind für das Wiederherstellen des PRDX/ TRX- sowie des GSH-Systems notwendig. Somit können Tumorzellen den erhöhten oxidativen Konditionen die sowohl intra- als auch extrazellulär in der Tumormikroumgebung durch Wachstumsfaktorstimulation, Hypoxie oder mitochondrialer Fehlfunktion verursacht werden, entgegenwirken [91–93].

1.3.2.1 Redox-Signalwege im Darm

Durch den engen Kontakt mit der intestinalen MO-Flora als auch verschiedenen Nahrungsbestandteilen ist der GIT anfällig für erhöhten oxidativen Stress [94]. Hierbei kann sowohl eine erhöhte als auch zu niedrige Konzentration an ROS die intestinale Proliferation behindern [51]. Über die Wnt und Notch-Signalwege sowie durch *bone morphogenic proteins* (BMP) werden die Stammzell-Erneuerung, Zellproliferation, Migration und Differenzierung im Darm stark kontrolliert. Insbesondere der Wnt- und Notch-Signalweg sind als redox-sensitiv beschrieben, da sie über die Aktivität der NOX moduliert werden können [95].

Das Redox-Signaling im Kolonepithel erfolgt hauptsächlich durch die Funktionen *Dual oxidase 2* (DUOX2), die H_2O_2 generiert und NOX1, die aufgrund der erhöhten Expression im Kolon auch als Kolon-NOX bezeichnet wird und das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) enzymatisch bildet [96]. Über die $O_2^{\cdot-}$ Bildung der NOX1 wird beispielsweise *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN), eine dual-spezifische Proteinphosphatase und bekannter Tumor-Suppressor reguliert. So konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen von $O_2^{\cdot-}$ durch einen NOX1-KO im Kolongewebe von Mäusen die Oxidierung am Cys^{124} sowie die Phosphorylierung an Ser^{380} reduziert. Die dadurch erhöhte PTEN-Aktivität führt zu einer Inaktivierung des Wnt-Signalweg Effektors Beta-Catenin und hat somit einen Einfluss auf die Zellproliferation als auch –differenzierung im murinem Kolongewebe [95]. Ein weiterer Tumor-Suppressor mit zehn Cys in der AS-Sequenz und somit vielfältigen möglichen oxPTM ist das *Cellular tumor antigen p53* (p53), bei dem postuliert wird, dass eine oxPTM an Cys-Resten als Schalter der Regulation dient [97]. So könnte der Redoxstatus von Cys^{277} einen Einfluss auf die Bindungskapazität von p53 an entsprechende Regulations-proteine haben und somit dessen Funktion oder Aktivität diktieren [98]. Eine verminderte transkriptionale Aktivität durch Oxidation von p53 führt weiter zu einer Inaktivierung von p53-Zielgenen, wie *Apoptosis regulator BAX* (BAX) oder *Apoptosis regulator Bcl-2* (BCL2), was zu einer Inhibierung der Apoptose führt und Karzinome induzieren kann [97,99]. PTEN und p53 stellen zwei Proteine dar, deren Funktionen im Kolongewebe oder im Kolonkarzinom über Redox-Signaling moduliert werden kann. Weitere redox-sensitive Proteine im Kolongewebe sind in verschiedenen Übersichtsartikeln aufgeführt ([51,94,97]).

1.3.3 Selen als Modulator der Redox-Regulation

In Bezug auf den Einfluss von Selen auf Redox-Signalwege muss zwischen den Selenoprotein-vermittelten Effekten und den möglichen direkten Effekten der aufgenommen Se-Verbindungen unterschieden werden. Selenolate ($-Se^-$) können mit molekularem Sauerstoff unter der Bildung von Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) reagieren. Ähnliches

wurde für Se-Verbindungen beschrieben, die eine Autoxidation erfahren, wobei ebenfalls O_2^- und H_2O_2 gebildet werden [100]. Insbesondere in hohen Konzentrationen wirken manche Se-Verbindungen wie z.B. Selenit pro-oxidativ und können folglich Zytotoxizität und zelluläre Apoptose induzieren [101]. Dem essentiellen Intermediat der Selenoproteinbiosynthese H_2Se wird ebenso eine Schlüsselrolle in der von Se vermittelten Toxizität zugeschrieben [102], da H_2Se durch Reaktion mit O_2 sowie freien Thiolen zur ROS-Bildung führen kann [103]. Die organische AS Sec liegt frei zwar in sehr geringen Konzentrationen zellulär vor, jedoch kann ein geringer Überschuss durch Induzierung von oxidativem Stress, Störungen der Proteindegradation sowie ER-Stress toxisch wirken [104]. Weiterhin können die organischen Se-Verbindungen SeMet und Sec während der Proteintranslation anstelle von Met bzw. Cys eingebaut werden [23,105,106], was auch die Entstehung potenziell toxischer Produkte fördert [107].

1.4 Einfluss von Se bzw. Selenoproteinen auf die menschliche Gesundheit

1.4.1 Physiologischen Funktionen von Se

Mit Entdeckung der Essentialität von Se sowie der Selenoproteine stieg das Interesse an der bedeutenden Rolle von Se sowohl für die menschliche Gesundheit als auch bei Erkrankungen. Se werden hierbei spezifische Funktionen sowie Effekte im menschlichen Organismus zugeschrieben (Abbildung 1-6).

Durch die breite Verteilung im Körper ist Se an vielen physiologischen Prozessen beteiligt und der zugrunde liegende Se-Status spielt hierbei eine entscheidende Rolle [69]. Zur Bestimmung des Se-Status werden verschiedene Biomarker herangezogen. Zum einen die Se-Konzentration im Vollblut oder Serum, in Haaren, Nägeln oder Urin und zum anderen die Mengen bzw. Enzymaktivitäten von Selenoproteinen wie SELENOP bzw. GPx im Serum, in Erythrozyten sowie in verschiedenen Geweben [108–110].

Über die drei Iodothyronin Deiodinasen (DIO) moduliert Se Funktionen der Schilddrüse, das Organ mit der höchsten Se-Konzentration [111]. DIO´s sind an der Synthese der aktiven Form des Schilddrüsenhormons Trijodthyronin (T3) beteiligt und zusätzlich schützt die GPx3 Schilddrüsenzellen vor H_2O_2-vermittelter Veränderungen [69].

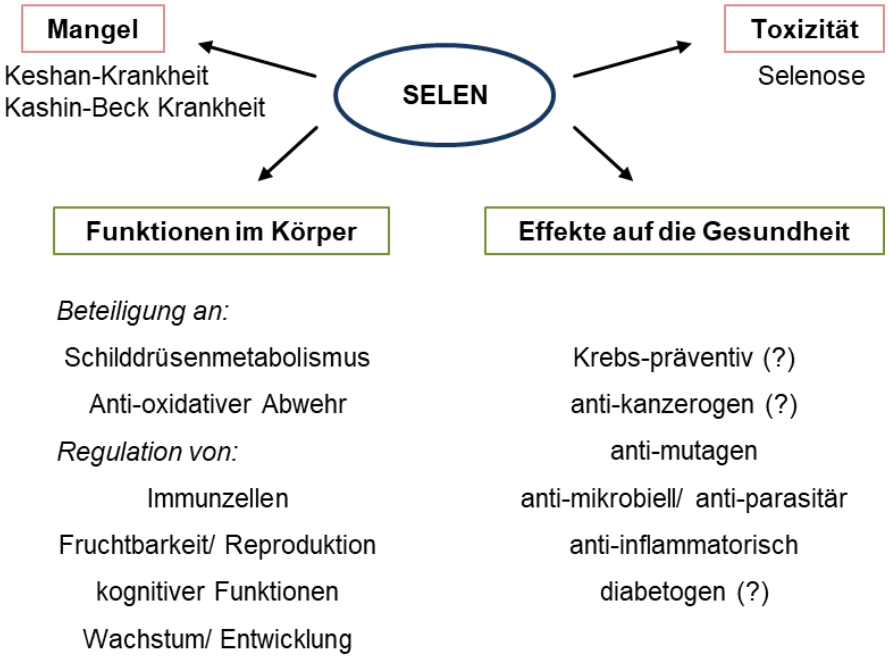

Abbildung 1-6: Die Rolle von Se im menschlichen Organismus.

Neben Erkrankungen durch Se-Mangelzustände oder einer Se-Toxizität sind verschiedene Funktionen sowie Effekte von Se im menschlichen Körper beschrieben oder werden in der Literatur kontrovers diskutiert (gekennzeichnet mit (?)). Auf eine mögliche Krebs-präventive bzw. anti-kanzerogene Wirkung von Se wird im Kapitel 1.4.2 näher eingegangen.

Ebenfalls in Bezug auf die menschliche Fruchtbarkeit sowie Reproduktion spielt Se eine entscheidende Rolle [112]. So ist beispielsweise die GPx4 mit erhöhter Aktivität in den Hoden beschrieben und wird mit dem Schutz der DNA vor oxidativen Schäden von sich entwickelten Spermazellen in Verbindung gebracht [113]. Des Weiteren wurde ein geringer Se-Plasmaspiegel in frühen Schwangerschaftsphasen als verlässliche Variable eines geringen Neugeborenen-gewichtes bestätigt [114].

Abnormale Se-Plasmakonzentrationen in Patienten sind mit gestörten kognitiven Fähigkeiten und neuronalen Erkrankungen assoziiert, was eine wichtige Rolle von Se auf die Gehirnphysiologie aufgezeigt [115]. Das Immunsystem wird ebenfalls durch Se beeinflusst. Eine Se-Supplementierung erhöhte die Proliferationsrate von aktivierten T-Zellen sowie die Aktivität von Killerzellen [69,116,117]. Des Weiteren können Selenoprotein-defiziente T-Zellen aufgrund deren Unfähigkeit ROS abzubauen nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation nicht proliferieren [118]. Die Bedeutung der Selenoproteine bei der Entwicklung einer effektiven Immunantwort wird auch deutlich bei Individuen mit einem Defekt im *Selenocysteine insertion sequence-binding protein 2* (SBP2) Gen, wodurch die Selenoproteinsynthese vermindert ist. Diese bisher wenig bekannten Individuen besitzen eine verminderte totale Lymphozytenanzahl und zusätzlich ist deren T-Zell-Proliferation, nach entsprechender Stimulierung reduziert [119].

1.4.2 Einsatz von Se in der Krebsprävention und -therapie

Neben dem vielseitigen positiven Einfluss von Se auf physiologische Funktionen im Organismus war in den letzten Jahren insbesondere die Rolle von Se als krebspräventives Mittel von großem Interesse. Epidemiologische Studien der letzten vier Jahrzehnte wiesen sowohl auf geringere Krebssterberaten in Regionen mit hohen Boden-Se-Gehalten als auch auf eine inverse Korrelation bezüglich des Auftretens verschiedener Krebsarten mit Plasma-Se-Konzentrationen in diesen Populationen hin [69,120–122]. Eine Auswertung der NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) Untersuchung zeigte beispielsweise, dass diese inverse Korrelation nur in der Teilnehmergruppe mit Serum-Se-Konzentration bis 130 µg/l gefunden wurde, während sich in der Gruppe mit Serum-Se-Konzentrationen über 150 µg/l das Sterberisiko sogar leicht erhöhte [123].

Neben den Ergebnissen epidemiologischer Studien weisen zusätzlich verschiedene Tier- und *in vitro*- Experimente auf krebshemmende Eigenschaften von Se hin [124–127], wodurch neben den krebspräventiven Effekten auch der Einsatz von Se in der Krebstherapie diskutiert wurde. So zeigten Se-Supplementierungen zusätzlich zur konventionellen Therapie eine Verbesserung der Effektivität von chemotherapeutischen Medikamenten, verminderten Nebenwirkungen und verbesserten den Allgemeinzustand der Patienten ohne dabei den Effekt der Krebsbehandlung zu reduzieren [128–130]. Diese Resultate unterstützen die Annahme von Se-vermittelten anti-kanzerogenen Effekten, welche sich in verschiedenen randomisierten klinischen Studien zeigte. Jedoch sind deren Ergebnisse inkonsistent. In den 1990er Jahren demonstrierte die *Nutritional Prevention of Cancer* (NPC) Studie von Clark *et al.* eine signifikant reduzierte Inzidenz verschiedener Krebsformen inklusive Prostatakrebs und dem Kolorektalen Karzinom (KRK), nach einer Se-Supplementation von 200 µg Se-angereicherter Hefe und einem Beobachtungszeitraum von 4,5 Jahren im Vergleich zur Kontrollgruppe [131]. Jedoch zeigte nachfolgend die SELECT (*Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial*)-Studie mit einer großen Kohorte aus gesunden Männern, dass weder eine Se-Supplementierung mit 200 µg SeMet (Haupt-Se-Form von Se-angereicherter Hefe) noch mit Vitamin E einen präventiven Effekt hinsichtlich Prostatakrebs hatte, weshalb die SELECT-Studie vorzeitig beendet wurde. Zusätzlich zeigte sich eine nicht-signifikante Erhöhung der Diabetes Typ 2 Inzidenz bei den SeMet-supplementierten Patienten der SELECT-Studie [132,133].

Bei Betrachtung der basalen Plasma-Se-Konzentrationen zeigten sich in der NPC Studie die eindeutigsten anti-kanzerogenen Effekte der Se-Supplementierung bei Teilnehmern mit weniger als 106 µg Se/l im Plasma, während in der SELECT-Studie insbesondere die Teilnehmer mit anfänglichen Plasma-Se-Konzentrationen von über 120 µg/l nicht von einer Se-Supplementierung bezüglich eines krebspräventiven Effektes profitierten [133]. Dies

verdeutlicht die Abhängigkeit der Effekte einer Se-Supplementierung von dem basalen Se-Status der Patienten und weist auf eine U-Verteilung hinsichtlich Se-Status und der Prävention vor Krebserkrankungen hin (Abbildung 1-7) [134,135].

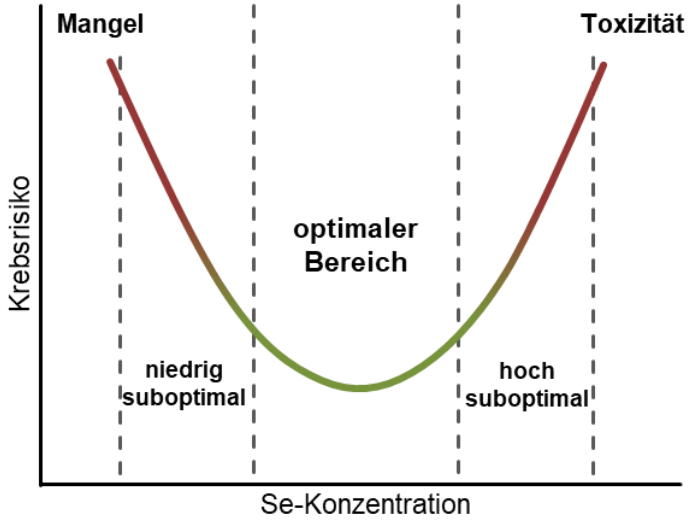

Abbildung 1-7: U-Verteilung zwischen Se-Status und Krebsrisiko.

Ergebnisse verschiedener klinischen Studien weisen auf einen U-förmigen Zusammenhang hinsichtlich Se-Aufnahme bzw. –Status und des Risikos an Krebs zu erkranken hin. Es gibt einen engen optimalen Bereich, wohingegen zu hohe als auch zu niedrige Se-Konzentrationen bereits einen Krebsrisiko-erhöhenden Effekt aufzeigen. Modifiziert nach [136].

1.4.3 GPx2 und Tumorerkrankungen im Kolon

Wie zuvor erwähnt, wird der GPx2 eine Rolle bei der Zellproliferation zugeschrieben (siehe Kapitel 1.2.2). In diesem Zusammenhang steht auch eine erhöhte Expression der GPx2 in Tumoren im Vergleich zum normalen Gewebe, die z.B. für kolorektale Adenome [137], kolorektale Karzinome (KRK) [138] sowie für gut bzw. mäßig differenzierte Kolontumore [52,139] aufgezeigt wurde. Zusätzlich konnte eine erhöhte GPx2 Expression in Tumoren epithelialen Ursprungs gefunden werden. Dazu gehören Plattenepithel-karzinome der Haut [140,141], Adenokarzinome der Lunge [142] sowie invasive Mammakarzinome [143].

Die zugrundeliegende Funktion der GPx2 in der intestinalen Tumorentwicklung wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* näher untersucht. Ein GPx2-*knock down* in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29 wies darin sowohl auf eine anti- als auch eine pro-kanzerogene Rolle der GPx2 hin. Zum einen bildeten GPx2-*knock down*-Zellen im Test für die Fähigkeit zum verankerungsunabhängigen Wachstum (Softagar-Test) weniger Kolonien aus sowie nach Injektion in Nacktmäuse kleinere Tumore im Vergleich zur Kontrolle. Jedoch zeigte sich zum anderen sowohl eine erhöhte Migrationsfähigkeit als auch Invasivität dieser Zellen *in vitro* [144]. Mausmodelle zeigten weiter auf, dass ein GPx2-KO

mit einer erhöhten Apoptoserate im Kryptengrund des intestinalen Epithels korrelierte [58] sowie, dass diese Mäuse anfälliger für UV-Licht induzierte Hautkarzinome [140] als auch Entzündungen der Atemwege sind [145]. Diese Ergebnisse weisen neben anti-kanzerogenen auch auf anti-inflammatorische Funktionen der GPx2 hin. So entwickelten in einem Modell der Colitis-assoziierten Kolonkanzerogenese (Azoxymethan (AOM)/ Dextrannatriumsulfat (DSS)) GPx2-KO Mäuse eine schwerere DSS-induzierte Colitis sowie mehr Tumore durch AOM-Gabe als die WT-Mäuse [127]. Insgesamt weisen diese Studien auf eine Rolle der GPx2 in der kolorektalen Tumorentwicklung hin.

1.5 2D-Gelelektrophorese zur Untersuchung des Proteoms

Die zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese (2DE) stellt eine der ältesten und ausgesprochen nützliche Methode zur Separation von Proteinen aus komplexen biologischen Proben dar [146]. Die Technik nutzt die Möglichkeit, Proteine basierend auf deren physiochemischen Eigenschaften, wie dem isoelektrischen Punkt (p*I*) und dem Molekulargewicht zu trennen und erlaubt die relative Proteinquantifizierung zwischen verschiedenen Proben.

Ein wichtiger Fortschritt war die Entwicklung der Differenz-Gelelektrophorese (DIGE) [147,148], mit Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen zur Protein-markierung. Dies ermöglicht die Auftrennung von bis zu drei Proteinproben auf einem 2D-Gel. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgt vor der 2DE und differentiell regulierte Proteine werden nachfolgend mittels Massenspektrometrie identifiziert (Abbildung 1-8).

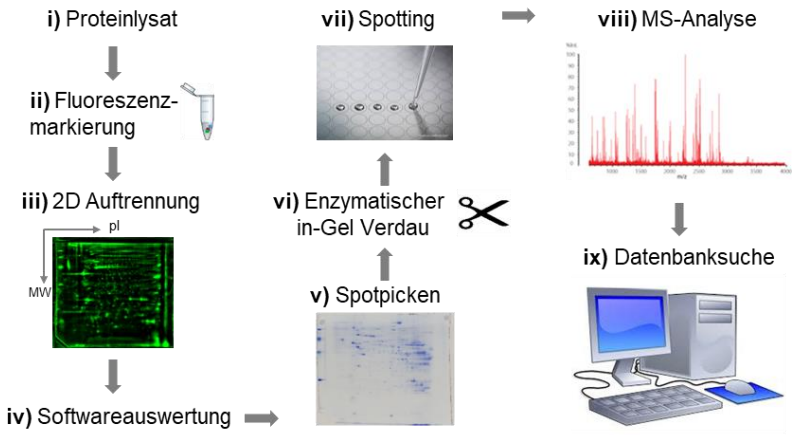

Abbildung 1-8: Ablauf der 2D-DIGE.

Dargestellt sind die Schritte i) bis ix), die bei allen 2D-DIGE Experimenten durchlaufen werden. Die einzelnen experimentellen Schritte werden im Kapitel 3.4.5 beschrieben.

Neben Gesamt-Protein Proben ist es möglich sowohl subzelluläre Proteinfraktionen als auch Proteinkomplexe mittels 2D-DIGE aufzutrennen [149]. Die Einführung der 2D-DIGE

führte zu einem erhöhten Durchsatz, einer einfacheren Anwendung sowie erhöhte die Reproduzierbarkeit, eliminierte Gel-zu-Gel Variationen und erlaubte eine akkuratere Quantifizierung von Unterschieden in der Proteinmenge verschiedener Proben [147].

1.5.1 Gel-basierte Proteom-Untersuchungen nach Se-Supplementierung

Zur Analyse des Selenoproteoms von verschiedenen Geweben bzw. Zelllinien wurden diese mit dem radioaktiven Isotop ^{75}Se markiert, mittels 1D- oder 2DE aufgetrennt und autoradiografisch detektiert. Dadurch wurde spezifisch die Regulation einzelner Selenoproteine oder die Identifizierung neuer Selenoproteine ermöglicht [150–153]. Erste Studien zu Effekten einer Se-Supplementierung auf die Proteinmenge von Nicht-Selenoproteinen wurden zur näheren Aufklärung von Kardiomyopathien (z.B. Keshan-Krankheit) durchgeführt, die mit einem Se-Mangel in Verbindung stehen [154,155]. In Versuchen mit Ratten wurden beispielsweise Proteine des myokardialen Energiemetabolismus sowie des kontraktilen Apparates des Herzmuskels im Se-Mangel im Vergleich zur adäquat versorgten Gruppe (Selenit) detektiert [154]. Da unter supranutritiven Dosen die Selenoproteinmenge ein Plateau erreicht, kamen u.a. zur Identifizierung möglicher Selenoprotein-unabhängiger Biomarker für den Se-Status 2DE-Experimente zum Einsatz [156,157]. In Rattenplasma konnte eine erhöhte Menge von Apolipoprotein E sowie Transthyretin nach Gabe der chemoprotektiven Se-Verbindung Selenomethylselenocystein (SeMSeCys) im Vergleich zu einer Selenat-Supplementierung detektiert werden, woraufhin diese Proteine als mögliche Biomarker eines bioaktiven Se-Status nach SeMSeCys-Supplementierung benannt wurden [158]. Schließlich wurde die Technik der 2DE auch in *in vitro*-Experimenten eingesetzt, um die Veränderung des Proteoms von Caco-2-Zellen nach Behandlung mit Se-Verbindungen oder Se-Nanopartikeln [159], anti-kanzerogene Effekte von Se auf Proteinebene in HeLa-Zellen [160] und Prostatakarzinom Zelllinien (PC-3, LNCaP) sowie die Wechselwirkung von Se und Seneszenz in WI-38 Fibroblasten [161] zu untersuchen.

2 ZIELSTELLUNG

Das Spurenelement Se wird hinsichtlich seiner präventiven Eigenschaften bei menschlichen Erkrankungen kontrovers diskutiert. In bisher durchgeführten Studien wurde zum einen meist nur der biologische Effekt einer Se-Verbindung untersucht und zum anderen wurden unterschiedliche Konzentrationen eingesetzt. Weiter spielen Se sowie Selenoproteine eine entscheidende Rolle in der zellulären Redox-Homöostase, insbesondere werden der GPx2 spezielle Funktionen sowohl in der Zellproliferation als auch der Kanzerogenese im Kolon zugeschrieben. Aus diesem Grund sollten in der vorliegenden Dissertation folgende Fragestellungen untersucht werden:

I. Zeigen die drei Se-Verbindungen Selenit, Selenat und SeMet einen unterschiedlichen Einfluss auf das Proteom im murinen Kolongewebe im Vergleich zum Se-Mangel?

   a. Welche Se-Konzentration hat einen besonderen Effekt? Eine Se-adäquate (ad; 150 µg Se/ kg Diät) Supplementierung oder eine Se-Überversorgung (ho; 750 µg Se/ kg Diät)?
   b. Können differentiell exprimierte Proteine in funktionelle Gruppen klassifiziert werden?
   c. Inwieweit lassen sich differentiell exprimierte Proteine im murinen Kolongewebe als auch in humanen Kolonkarzinom-Zelllinien validieren?

II. Wird der Redoxstatus von Proteinen im murinen Kolongewebe signifikant durch die Se-Verbindungen Selenit, Selenat und SeMet im Vergleich zu einem Se-Mangel beeinflusst?

   a. Welche Se-Konzentration hat einen besonderen Effekt auf den Redoxstatus? Ein Se-adäquate (150 µg Se/kg Diät) Supplementierung oder eine Se-Überversorgung (750 µg Se/ kg Diät)?
   b. Werden bestimmte funktionelle Gruppen an Proteinen durch die Se-Verbindungen redox-modifiziert?
   c. Können entsprechende Ergebnisse validiert werden?

III. Welchen Einfluss zeigt ein GPx2-KO im Vergleich zum Wild-Typ (WT) auf das Proteom im murinen Kolongewebe?

   a. Zeigt eine adäquate Selenit-Supplementierung bzw. ein Se-Mangel einen zusätzlichen Einfluss?
   b. Können differentiell exprimierte Proteine in funktionelle Gruppen klassifiziert werden?
   c. Inwieweit lassen sich differentiell exprimierte Proteine im murinen Kolongewebe validieren?

Zur Beantwortung dieser Fragen soll ein erster Fütterungsversuch mit C57BL/6j Mäusen mit Supplementierung der Se-Verbindungen Selenit, Selenat und SeMet in je 2 Konzentrationen (adäquat (ad), 150 µg Se/ kg Diät; hoch (ho), 750 µg Se/ kg Diät) im Vergleich zu einem Se-Mangel durchgeführt werden. Als Methode zur Untersuchung des murinen Kolonproteoms soll die 2D-DIGE zum Einsatz kommen und zur Überprüfung des

Einflusses der Se-Verbindungen auf den Redoxstatus von Kolonproteinen soll eine neue Variante der Redox-DIGE Anwendung finden. Neue Se-regulierte bzw. durch Se redox-modifizierte Proteine sollten nachfolgend hinsichtlich ihrer biologischen Funktionen gruppiert und mit entsprechenden Methoden wie qPCR und Immuno-Blot sowie der Einfluss von Se auf ausgewählte Proteine auch in humanen Kolonkarzinom-Zelllinien validiert werden.

Ein zweiter Fütterungsversuch mit GPx2-KO und entsprechenden WT Mäusen soll zusätzlich den Einfluss des GPx2-KO´s und/ oder einer Selenit-Supplementation auf das Proteom des murinen Kolongewebes untersuchen. Mögliche Veränderungen des Kolonproteoms sollten dafür ebenfalls mittels 2D-DIGE detektiert werden um dadurch das Verständnis der GPx-2-Funktionen zu erweitern.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Verwendete Chemikalien und Geräte im Überblick

Tabelle 3-1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
3-(benzyldimethylammonio)-1-propanesulfonate (NDSB)-256	Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
5,5′-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München, Deutschland
α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure (HCCA)	Bruker Daltonics Inc., Bremen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	AppliChem GmbH
Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Acetonitril (ACN)	AppliChem GmbH
Acrylamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Acrylamid/Bis Lösung, 37,5:1	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Agarose	BioLine GmbH, Luckenwalde, Deutschland
Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumbicarbonat	AppliChem GmbH
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem GmbH
Ammoniumsulfat	AppliChem GmbH
Ampuwa Wasser	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Bromphenolblau	AppliChem GmbH
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
CHAPS	AppliChem GmbH
Chloroform	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie-Brillant-Blau G-250	AppliChem GmbH
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem GmbH
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem GmbH
DMEM Zellkulturmedium	Gibco® by life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Chemikalie	**Hersteller**
Ethanol, absolut	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glutathion	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glutathionreduktase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Guanidinthiocyanat	AppliChem GmbH
Glycerin, wasserfrei	AppliChem GmbH
Glycin	AppliChem GmbH
Harnstoff	AppliChem GmbH
Immobiline DryStrip Cover fliud	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Immobiline DryStrip pH 3-10 NL,18 cm	GE Healthcare
Jodacetamid	AppliChem GmbH
Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kaliumchlorid	AppliChem GmbH
Kaliumhydrogenphosphat	AppliChem GmbH
L-Glutamin	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
LMW SDS-PAGE Marker Kit	GE Healthcare
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumhydrogencarbonat	AppliChem GmbH
Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumazid (NaN_3)	AppliChem GmbH
Natriumacetat	AppliChem GmbH
Natriumchlorid	AppliChem GmbH
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH
Natriumselenat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumselenit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
N-Lauryl-Sarcosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ortho-Phosphorsäure	Merk KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pharmalytes pH 3-10	GE Healthcare
Penizillin/Streptomyzin Mix	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Peptide Calibration Standard II	Bruker Daltonics Inc., Bremen, Deutschland
Phenol-Lösung (gesättigt)	Carl Roth GmbH + Co. KG
protease inhibitor cocktail II	Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
Proteinmarker	(Fermentas) Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
RPMI Zellkulturmedium	Gibco® by life Technologies
Salzsäure, 32%	Carl Roth GmbH + Co. KG
Selenomethionin	Calbiochem, Merck Millipore
Magermilch	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem GmbH
Thioharnstoff	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trifluoressigsäure	AppliChem GmbH
Tri-Natriumcitrat	Carl Roth GmbH + Co. KG
Tris-aminomethan (TRIS)	AppliChem GmbH
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trypsin	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung (10x)	PAA Laboratories GmbH
Tween 20	AppliChem GmbH

Tabelle 3-2: Übersicht über die verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller
1D-Laufkammer Mini-PROTEAN	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
2D-Laufkammer PROTEAN Plus Dodeca Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH
Spot picker GelPal (semimanuell)	Genetix, München, Deutschland
Spot Hunter	Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland
Cup loading strip holder	GE Healthcare
DigestPro MSi	INTAVIS Bioanalytical Instruments AG, Köln, Deutschland
Fluoreszenz Scanner (FLA 5000)	Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland
Western Blot Kamera; Fuji-Film LAS-3000 *Imager*	Fujifilm, Sheffield, Großbritannien
Doppelplattformscanner	SERVA Electrophoresis GmbH
Gießkammer für 2D-Gele, Hoefer DALT *multiple Gel Caster*	GE Healthcare
CO_2-Inkubator (Zellkultur)	Thermo Fischer Scientific
Isoelektrische Fokussierungseinheit Ettan IPGphor	GE Healthcare
Kühlzentrifuge	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Mikroplatten-Messstation (Infinite M200 PRO)	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz

Gerät	Hersteller
Luminometer (Microlumat Plus CB 96V)	Berthold Technologies GmbH & Co.KG, Bad Wildbad, Deutschland
qPCR-*Cycler* (Rotorgene-Q)	QIAGEN, Hilden, Germany
SONOPLUS Ultraschall Homogenisator HD2070	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Spektralphotometer Ultrospec 3300 pro	(Amersham Biosciences) GE Healthcare
Taumelschüttler (BlueShake 3D)	SERVA Electrophoresis GmbH
Stromgeber	SERVA Electrophoresis GmbH
Tischzentrifuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
TissueLyser	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Trans-Blot® transfer cell, Western Blot	Bio-Rad Laboratories GmbH
ultrafleXtreme^{TM} Massenspektrometer	Bruker Daltonics Inc.
Zellkultursterilbank	Hereaus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland

Verwendete Plastikverbrauchswaren wurden von Sarstedt (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) oder Greiner Bio-One (Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland) bezogen.

3.2 Fütterungsversuche mit Mäusen

3.2.1 20-wöchiger Versuch mit C57BL/6j Mäusen

Vier Wochen alte männliche C57BL/6j Mäuse erworben von *Harlan Laboratories* (Horst, Niederlande) wurden unter konventionellen Bedingungen gehalten (Raumtemperatur (RT), 12 h Tag-/ Nachtrhythmus) und erhielten freien Zugang zu den entsprechenden Diäten (Tabelle 3-3) und autoklaviertem Trinkwasser.

Die Fütterungsversuche waren durch das Ethikkomitee der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (42505-2-1187MLU) genehmigt. Die Mäuse wurden randomisiert in sieben Gruppen mit je acht Individuen eingeteilt und erhielten Diäten mit entweder adäquaten (ad, 150 µg Se /kg Diät) oder supra-nutritiven (ho, 750 µg Se /kg Diät) Se-Konzentrationen in Form von Natriumselenit, Natriumselenat und Selenomethionin (SeMet). Die Kontrollgruppe erhielt eine Selen-arme Basisdiät. Die Zusammensetzung der Diät entspricht mit Ausnahme der Se-Konzentration den Empfehlungen des *American Institute of Nutrition* für wachsende Mäuse (AIN-93G [162]) und basierte auf Torula-Hefe und Se-armen Weizen (Tabelle 3-3). Der Se-gehalt der Diäten wurde bestätigt durch eine massenspektrometrische Analyse mit induktiv gekoppeltem Plasma (*inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS) [163].

Tabelle 3-3: Zusammensetzung der Versuchsdiäten.

Bestandteil	g/ kg Diät
Torula-Hefe (Attisholz, Solothurn, Schweiz)	300
Se-armer Weizen (Vogelsbergregion in Hessen, Deutschland)	100
Zellulose BWW 40 (Rettenmaier, Rosenberg, Germany)	50
Glukose (Sigma-Aldrich Chemie)	50
Saccharose (Südzucker, Mannheim, Deutschland)	50
Sojabohnen Öl (Hessen)	50
DL-Methionin (Degussa, Düsseldorf, Deutschland)[1]	3
L-Tryptophan (Sigma-Aldrich Chemie)[1]	0,5
Mineralien-Vormischung (alle Salze von Sigma-Aldrich Chemie)[2]	30
Vitamin-Vormischung (alle Vitamine von Roche, Basel, Schweiz)[1]	30
Maisstärke (Roquette, Lestrem, Frankreich)	336,5
Se-Vormischung[3]	0
Summe	1000

[1] Zugesetzt entsprechend der Empfehlung des AIN-93G. [2] Zugesetzt entsprechend der Empfehlung des AIN-93G mit Se als Ausnahme. [3] Für die Se-supplementierten Diäten wurden 25 g bzw. 125 g Maisstärke durch einen gleichen Anteil an Se-Vormischung ersetzt, welche auf Maisstärke basierte aber 6 mg Se /kg Diät als Natriumselenit, Natriumselenat und SeMet enthielt.

3.2.2 8-wöchiger Versuch mit GPx2 *knockout* (KO) Mäusen

Vor Versuchsbeginn wurden C57BL/6j (Wildtyp, WT) Mäuse und GPx2 KO Mäuse, welche als C57BL/6j;129SV/J Hybrid generiert wurden, auf den C57BL/6j Stamm zurückgekreuzt [164]. Entsprechende Versuchstiere wurden randomisiert in vier Gruppen mit je neun Individuen aufgeteilt und erhielten entweder eine Se-supplementierte Diät (150µg Selenit/ kg Diät) oder eine Se-Mangel-Diät basierend auf der Zusammensetzung in Tabelle 3-3. Der Fütterungsversuch wurde unter spezifisch pathogen-freien (SBF) Konditionen mit einem 12 h Tag-/ Nachtrhythmus durchgeführt, wobei die Mäuse freien Zugang zu Futter und Trinkwasser hatten. Dieser Versuch war sowohl durch das Tierschutzkomitee des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke (DIfE) als auch durch die örtlichen Behörden (Landesamt für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz, Brandenburg, Deutschland) genehmigt worden. Nach acht Wochen wurden die Mäuse unter CO_2-Anästhesie enthauptet und das Kolongewebe entnommen. Dieses wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C für nachfolgende Analysen gelagert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung von RNA

Die RNA wurde unter der Verwendung der Methode von Chomczynski und Sacchi [165] aus den Kolongeweben extrahiert. Zu Beginn wurden dafür ca. 40 mg Gewebe abgewogen und mit 600 µl Homogenisierungspuffer versetzt.

Homogenisierungspuffer: 4 M Guanidinthiocyanat, 25 mM Tri-Natriumcitrat (pH 7.0), 0,5 % (w/v) N-Lauryl-Sarcosin, 0,1 M β-Mercapto-ethanol

Nach anschließender Homogenisierung mittels *TissueLyser* erfolgte eine Zugabe von 60 µl 2 M Natriumacetat mit nachfolgender Durchmischung durch Inversion. Nach Zugabe von 600 µl gesättigter Phenol-Lösung und Durchmischung mittels Inversion wurden 225 µl eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (50:1) hinzu pipettiert, das Reaktionsgefäß verschlossen, 1 Min bei maximaler Leistung auf einem Durchmischer homogenisiert und 15 Min auf Eis inkubiert. Nach wiederholtem Durchmischen wurden die Proben zentrifugiert (2°C, 20 Min, 13000 rpm) wonach drei unterschiedliche Phasen zu erkennen waren. 600 µl der oberen Phase, welches die wässrige Guanidinthiocyant-Phase mit gelöster RNA darstellte wurden abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde mit 600 µl Isopropanol (-20°C) für mindestens 1 h bei -20°C gefällt. Es folgte die erste Präzipitation der RNA durch zentrifugieren (2°C, 20 Min, 13000 rpm) wonach der Überstand verworfen, das entstandene RNA-Pellet mit 200 µl Homogenisierungspuffer gelöst und nach Zugabe von 200 µl Isopropanol mindestens 30 Min bei -20°C inkubiert wurde. Nach dieser zweiten Fällung wurden die Proben zentrifugiert (2°C, 10 Min, 13000 rpm) und folgend zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Das nach abschließender Zentrifugation (2°C, 5 Min, 13000 rpm) entstandene RNA-Pellet wurde 10 bis 15 Min bei RT getrocknet und in einem entsprechenden Volumen an Nuklease-freiem Wasser gelöst (60°C, 10 Min, 900 rpm). Anschließend wurde die RNA-Konzentration an einer Mikroplatten-Messstation vermessen.

3.3.2 DNA-Verdau und cDNA Synthese

Vor dem Umschreiben der RNA in die komplementäre cDNA (engl. *complementary desoxyribonucleic acid*, cDNA) wurde ein Verdau noch vorhandener DNA durchgeführt, da diese nachfolgende qPCR-Reaktionen (siehe 3.3.3) stören könnte. Der Ansatz für diesen Verdau setzte sich wie folgt zusammen:

RNA	1 µg
10x Reaktionspuffer	1 µl
DNAse I, RNAse-frei	1 µl (1U) (Thermo-Scientific)
Nuklease-freies Wasser	auf 10 µl

Dieser Ansatz wurde für 30 Min bei 37°C inkubiert. Folgend wurde zur Inaktivierung vorhandener Nukleasen je 1 µl einer 50 mM EDTA Lösung hinzugegeben und für 10 Min bei 65 °C inkubiert. Nach der RNA-Konzentrationsbestimmung wurden 500-1000 ng RNA während der reversen Transkription in cDNA unter Verwendung einer reversen Transkriptase (RT) umgeschrieben (*RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific). Zu Beginn wurde der eingesetzten Menge an RNA (in 11 µl) 1 µl Oliga $(dT)_{18}$ Primer hinzugefügt und für 5 Min bei 65°C inkubiert. Nach Hinzufügen von 8 µl des Master Mixes wurden die Proben 60 Min bei 42°C und folgend 5 Min bei 70°C inkubiert. Die cDNA wurde kurzzeitig bei 4°C oder bei -20°C gelagert.

Master Mix:

5x Reaktionspuffer	4 µl
Ribolock RNAse Inhibitor (20 U/ µl)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid RT (200 U/ µl)	1 µl

3.3.3 *Real-time* Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) werden *in vitro* gezielt Genabschnitte durch eine DNA-Polymerase vervielfältigt [166]. Als Startpunkte benötigt die DNA-Polymerase *Primer*, welche einzelsträngige DNA-Moleküle darstellen und komplementär zu den Enden einer definierten DNA-Sequenz sind. Die verwendeten Primer-Sequenzen wurden mit *Primer-BLAST* [167] erstellt, und sind in Tabelle 3-4 aufgelistet. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen (Thermo Fisher Scientific) hergestellt, sequenziert und anschließend in Nuklease-freiem Wasser gelöst sowie bei –20°C gelagert. Um die Vervielfältigung (Amplifikation) des Genabschnittes in Echtzeit (engl. *real time*) zu verfolgen, wird ein in die DNA interkalierender Farbstoff (SYBR®Green) hinzugefügt. Die Fluoreszenzintensität dieses Farbstoffes korreliert hierbei positiv mit der Amplifikationsmenge des PCR-Produktes.

Tabelle 3-4: Verwendete Primerpaare für die qPCR-Experimente.

Genname	mRNA Ref-Seq		Sequenz (5´>3´)	Produkt-größe (bp)
mus musculus				
Abhd14b	NM_029631.3	vor	GCACATTTCCAGGCACATCAC	395
		rück	CACGAGGAAGGGCAGTGAAT	
Anxa2	NM_007585.3	vor	CCCCAAGTGGATCAGCATCA	346
		rück	ACCCTTGGTGTCTTGCTGG	
Clca1	NM_017474.2	vor	GATAACGGAGCAGGTGCCG	486
		rück	TGAGGTGTTGAAGTGGTCCC	
Cfl1	NM_007687.5	vor	TCAAGATGCTGCCAGACAAGG	273
		rück	CCTCCAGGGAAATGACGGC	
Gapdh	NM_008084.3	vor	TTGTGCAGTGCCAGCCTCGT	214
		rück	TCGGCCTTGACTGTGCCGTT	
Gpx1	NM_008160.6	vor	GCGAAGTGAATGGTGAGAAGG	227
		rück	AGGTTCGATGTCGATGGTACG	
Gpx2	NM_030677.2	vor	CAGGGCTGTGCTGATTGAGA	256
		rück	ATGCTCGTTCTGCCCATTGA	
Lmna	NM_001002011.3	vor	CGCAACACCAAGAAGGAGGG	230
		rück	TTCTCAGCATCCACTCGCC	
Pgd	NM_001081274.1	vor	CATGGATTTGTGGTCTGTGC	211
		rück	CCGTGTCCAACAAGGGTACT	
Prdx5	NM_012021.2	vor	GAAGCAGGTTGGGAGTGTGG	214
		rück	GCAGGTGGGTCTTAGAACAGC	
Prdx6	NM_177256.5	vor	TCCTGGGAGATTCATGGGGC	280
		rück	TCGACTGGATCCAACATGCC	
Rpl13a	NM_009438.5	vor	GACCTCCTCCTTTCCCAGG	148
		rück	TTCACAGCGTACGACCACC	
Txnrd1	NM_001042523.1	vor	CCTATGTGCCCTTGGAATGT	390
		rück	TGTAAGGCACATTGGTCTGC	
homo sapiens				
ABHD14B	NM_032750.2	vor	CTGCTGCTGCATGGTATTCG	358
		rück	GAGCTGGAGTCTTCACACTGG	
ANXA2	NM_001002858.2	vor	GTGCATTCAGAACAAGCCCC	194
		rück	CGCCCTTAGTGTCTTGCTGG	
CAT	NM_001752.3	vor	TAACGTTACTCAGGTGCGGG	340
		rück	TTCATCCAGTGATGAGCGGG	
CFL1	NM_005507.2	vor	AGAAGCTGACAGGGATCAAGC	318
		rück	GAACCGTCAAGGGATGGAGG	
GAPDH	NM_002046.6	vor	GCCGTCTAGAAAAACCTGCC	444
		rück	TGGTACATGACAAGGTGCGG	
GPX1	NM_000581.3	vor	ACCTACGAGGGAGGAACACC	119
		rück	ACCCGGCACTTTATTAGTGGG	
GPX2	NM_002083.3	vor	CACACAGATCTCCTACTCCATCCA	75
		rück	GGTCCAGCAGTGTCTCCTGAA	
LMNA	NM_170707.3	vor	GCTCAATGATCGCTTGGCG	411
		rück	GCCTCAAGCTTGGCCACC	

Genname	mRNA Ref-Seq		Sequenz (5´>3´)	Produkt-größe (bp)
NQO1	NM_000903.2	vor	AAAGGACCCTTCCGGAGTAA	222
		rück	CCATCCTTCCAGGATTTGAA	
PGD	NM_002631.3	vor	CTCATCCAGGCTCAGCGG	185
		rück	AGGCACATGGAATGTCCTGG	
PRDX1	NM_002574.3	vor	GGCATCTCGTTCAGGGGC	395
		rück	GAAAGGCTGGTCTCTCCACC	
PRDX5	NM_012094.4	vor	ATGATGCCTTTGTGACTGGCG	343
		rück	CCAACATTCCAATTGCAGGGC	
PRDX6	NM_004905.2	vor	TGATAGGAATCGGGAGCTTGC	252
		rück	ATCACACTATCCCCATCCTTCC	
RPL13A	NM_012423.3	vor	CCCTACGACAAGAAAAAGCGG	413
		rück	GCTCCCAGCTTCCTATGTCC	
TXNRD1	NM_182729.2	vor	AGAGGCTCTATGCAGGTTCC	188
		rück	ATCTCTTGACGGAATCGTCC	

bp, Basenpaare; rück, rückwärts; vor, vorwärts.

In dieser Arbeit wurde die GoTaq® Flexi DNA Polymerase von Promega (Promega Corporation, Madison, USA) verwendet und ein Ansatz für einen qPCR-Lauf setzte sich folgendermaßen zusammen (1x):

cDNA Probe	1 µl
5x Reaktionspuffer	4 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	1,2 µl
dNTP Mix (je 10mM)	0,4 µl
Primer, vorwärts	0,05 µl
Primer, rückwärts	0,05 µl
SYBR®Green (1:1000)	0,2 µl
GoTaq® (5 U/ µl)	0,1 µl
Nuklease-freies Wasser	auf 20 µl Endvolumen

Die PCR-Reaktion läuft in drei Schritten ab:

1) Denaturierung des doppel-strängigen DNA-Stranges durch Hitze
2) Hybridisierung der Primer an die spezifischen DNA-Abschnitte und
3) Elongation durch die DNA-Polymerase ausgehend vom 3´-Ende der Primer.

Die qPCR wurde in einem *real time* PCR-*Cycler* durchgeführt, die einzelnen Schritte des Programms sind in Tabelle 3-5 aufgeführt.

Tabelle 3-5: Schritte der qPCR-Reaktion.

	Temperatur (°C)	Dauer	
Denaturierung	95	2 Min	
Denaturierung	95	30 Sekunden	40 Zyklen
Hybridisierung*	58	35 Sekunden	
Elongation	72	20 Sekunden	
Schmelzkurve	50-99	5 Sekunden/ °C	

*Eingesetzte Primer wurden so designt, dass die Hybridisierung in den entsprechend durchgeführten qPCR-Läufen bei 58 °C durchgeführt werden konnte.

Abschließend wurde von 50°C bis 99°C eine sogenannte Schmelzkurve generiert um das Entstehen des spezifischen Produktes zu beurteilen. Dieses Produkt wurde zusätzlich mittels Agarose-Gelelektrophorese in einem 1,5 %igen Gel hinsichtlich der spezifischen Größe überprüft. Die Amplifikationswerte der Zielgene wurden nach der Methode von Pfaffl berechnet [168]. Als Referenzgene dienten das Ribosomale Protein L13a (RPL13a) und die Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH).

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 Proteinextraktion für die Durchführung von Proteomanalysen

Für Analysen des Proteoms des murinen Kolongewebes wurden pro Versuchsgruppe vier biologische Replikate dreimal in eiskalter Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen um vorhandene Blutreste zu entfernen, welche die nachfolgende zweidimensionale Gelelektrophorese stören würden. Nachfolgend wurden die Kolonstücke zermahlen (*Readyprep mini grinders*, Bio-Rad *laboratories* GmbH) und im Differenz-Gelelektrophorese (DIGE)-Lysepuffer lysiert.

DIGE-Lysepuffer: 7 M Harnstoff , 2 M Thioharnstoff, 30 mM Tris, 4 % (w/v) CHAPS

Da nachfolgende Fluoreszenzmarkierungsstrategien (siehe Kapitel 3.4.3.1.1 bzw. 3.4.3.1.2) pH-Wert abhängig sind wurden Kolonlysate im DIGE Lysepuffer mit einem pH-Wert von 7,5 und 8,5 generiert. Die Zelllyse wurde zusätzlich durch eine Ultraschallbehandlung gesteigert, welche bei einer 70%igen Geräteleistung mit insgesamt zweimal 5 Zyklen á 0,5 Sekunden durchgeführt wurde. Durch die nachfolgende Zentrifugation (90 Min, 15 °C, 13000 rpm) wurden Zelltrümmer und Nukleinsäuren pelletiert, der entstandene Überstand abgenommen und bei -80 °C für weitere Analysen gelagert.

3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode

Die Methode nach Bradford [169] basiert auf der Komplizierung des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G250 (CCB G250) mit kationischen und unpolaren Seitenketten

von Proteinen. Durch die Bindung des Farbstoffes ändert sich dessen Absorptionsmaximum von 465 zu 595 nm. Jeweils 5 µl der murinen Kolongewebelysate wurden in Triplikaten mit Lysepuffer auf ein Endvolumen von 10 µl gebracht, 10 µl 0,1 M HCl zugegeben um den im Lysepuffer enthaltenen Harnstoff zu hydrolysieren und anschließend wurden pro Ansatz 80 µl ddH_2O hinzugegeben. Die resultierenden 100 µl wurden mit der Arbeitslösung des Bradford-Reagenz versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm an einem Spektralphotometer. Die Eichreihe mit Bovinem Serumalbumin (BSA) in den Konzentrationen von 5, 10, 15, 20, 25 und 30 µg/µl wurde entsprechend angesetzt.

Bradford-Reagenz (5x-Stocklösung): 42,5 % (v/v) Phosphorsäure
25 % (v/v) Ethanol
0,05 % (w/v) CCB G250

3.4.3 Analyse des Proteoms von murinem Kolongewebe mittels 2D-DIGE

3.4.3.1 Strategien zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

3.4.3.1.1 Minimalmarkierung

Für die Minimalmarkierung (engl. *minimal labeling*) der Proteinlysate des murinen Kolongewebes wurde das SERVA *Lightning SciDye Set* verwendet (SERVA, Heidelberg, Deutschland). Dies beinhaltete drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe, die sich in ihren Fluoreszenzeigenschaften unterscheiden (Tabelle 3-6). Durch diese unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften ist es möglich, drei Proteinproben auf einem 2D-Gel zu trennen, da markierten Proteine aufgrund der gleichen Ladung und nahezu gleichen Masse der Farbstoffe auf dem Gel ein gleiches Trennverhalten aufweisen.

Tabelle 3-6: Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe für die Minimalmarkierung.

	Sci2	**Sci3**	**Sci5**
Anregungsmaximum (nm)	490	555	645
Emissionsmaximum (nm)	510	570	660
Masse (monoisotopisch; Da)	550.20	582.33	580.32

Die Minimalmarkierung wurde mit 25 µg Protein (DIGE Lysepuffer pH 8,5) durchgeführt. Zusätzlich wurde durch die Mischung von 12,5 µg Protein über alle Proben ein interner Proteinstandard (IPS) worin jedes in den Proteinproben vorhandene Protein enthalten ist generiert. Die Markierung des IPS mit Sci2 bzw. der Einzelproben mit Sci3 oder Sci5 erfolgte bei einer Farbstoffkonzentration von 0,2 nmol/ µl. Dafür wurden 25 µg Protein mit DIGE-Lysepuffer (pH 8,5) zu einem Endvolumen von 9 µl pipettiert, 1 µl der Farbstoffarbeitslösung dazugegeben, anschließend gemischt, zentrifugiert und 30 Min auf

Eis inkubiert (dunkel). Tabelle 3-7 zeigt den Markierungsansatz für die 2D-DIGE-Analyse der murinen Kolongewebeproben des 20-wöchigen Fütterungsversuches.

Tabelle 3-7: Exemplarische Übersicht eines 2D-DIGE-Markierungsansatzes.

Gruppe	Se-Mangel	Selenit		Selenat		SeMet	
		ad	ho	ad	ho	ad	ho
Probenanzahl	n=4						
Proteinmenge Probe/ IPS	25 µg/ 12,5 µg						
Farbstoff (Probe)	jeweils Sci3/Sci5	Sci3	Sci5	Sci3	Sci5	Sci3	Sci5
Farbstoff IPS	Sci2						
Anzahl Gele	16 (pro Gel: Sci2/Sci3/Sci5)						

ad, adäquat; ho, hoch; IPS, interner Proteinstandard.

Die vier Proben der Se-Mangelgruppe wurden jeweils einmal mit Sci3 und einmal mit Sci5 markiert um bei der späteren Fluoreszenzintensitätsanalyse der Proteinspots sowohl für die ad-Se als auch ho-Se supplementierten Gruppen als Bezugsgruppe zu dienen. Dies war notwendig, um eine eventuelle Detektion von Expressionsunterschieden von Proteinen, entstanden durch die Fluoreszenzunterschiede der Farbstoffe zu vermeiden.

Während der Markierung entsteht eine Amidgruppe durch die kovalente Bindung zwischen der N-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester)-reaktiven Gruppe der Fluoreszenzfarbstoffe und der α-Aminogruppe von Lysinen der Proteinprobe [170]. Der Begriff Minimalmarkierung beschreibt dabei, dass durch diese Methode 1-2 % der vorhandenen Lysinreste der Proteine und theoretisch ein Lysinrest pro Proteinmolekül markiert werden. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1 µl einer 10 mM Lysin-Lösung pro Probe hinzu pipettiert um dadurch überschüssige Farbstoffmoleküle abzufangen. Die Proben wurden anschließend gemischt, zentrifugiert und 10 Min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurde zu jeder Probe um die Pufferverhältnisse für die nachfolgende isoelektrische Fokussierung zu erhalten im Verhältnis 1:1 2-fach-Puffer pipettiert (siehe Kapitel 3.4.3.3.1).

2-fach-Puffer: 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 30 mM TRIS, 4 % (w/v) CHAPS, 2 % (w/v) DTT, 1 % (v/v) Ampholyte pH 3-10 (GE)

Nach Aufteilung des IPS auf Reaktionsgefäße (pro Gel ein Reaktionsgefäß) wurden jeweils eine Sci3- und Sci5-markierte Probe hinzugefügt. Die markierten Proben konnten entweder bei -20°C kurzzeitig gelagert werden oder wurden direkt für die 2DE eingesetzt (siehe Kapitel 3.4.3.3).

3.4.3.1.2 Sättigungsmarkierung und Einsatz der 2D-Redox-DIGE zur Analyse des Redoxstatus von Proteinen

Im Gegensatz zur Minimalmarkierung der Proteine werden durch die Sättigungsmarkierung nach entsprechender Reduktion alle freien Cysteinreste von Proteinen markiert. Im Vergleich zur Minimalmarkierung kann durch die Sättigungsmarkierung eine geringere Proteinmenge (5 µg) markiert werden, was beispielsweise bei einem geringen Probenvolumen von Vorteil ist. Zusätzlich können durch diese Methode aufgrund der Zielstruktur der Cys-Seitenkette von Proteinen redox-sensitive Cysteinreste bzw. der Redoxstatus eines Proteins ermittelt werden.

Durch die Se-Supplementierung könnten neben Veränderungen im Gesamtproteom auch Veränderungen hinsichtlich des Redoxstatus einzelner Proteine des murinen Kolongewebes auftreten. Um dies zu untersuchen wurde in der vorliegenden Arbeit ein neuer Ansatz der Redox-DIGE in Anlehnung an die Methode von Hurd *et al.* [171] bzw. Poschmann *et al* [172] entwickelt. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit der Firma NH DyeAGNOSTICS GmbH (NHD, Halle (Saale), Deutschland). Die zwei verwendeten Cys-reaktiven Fluoreszenzfarbstoffe des neu entwickelten Saturn-2D™ REDOX Labeling Kits (NHD) hatten folgende Eigenschaften (Tabelle 3-8):

Tabelle 3-8: Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe der 2D-Redox-DIGE-Markierung.

	S300	**S300**
Anregungsmaximum (nm)	555	649
Emissionsmaximum (nm)	576	664
Masse (monoisotopisch; Da)	Bei NHD zu erfragen.	

In diesem neuen Redox-DIGE Ansatz wurden von jeder murinen Kolongewebeprobe zwei Subproteome und somit zwei 2D-Gele generiert. Während die direkte Markierung (di-M) die reduzierten Thiole (-SH) adressierte, wurden durch die indirekte Markierung (ind-M) die oxidierten Thiole (S-OX) detektiert. Für beide Markierungen wurden je 5 µg Kolongewebelysat (DIGE Lysepuffer pH 7,5) mit DIGE-Lysepuffer (pH 7,5) auf 9 µl Endvolumen pipettiert. Parallel wurden für den IPS ebenfalls zweimal 5 µg Kolongewebelysat pro Probe zusammen pipettiert. Die wichtigsten Schritte des Markierungsablaufs sind in Abbildung 3-1 schematisch dargestellt. Alle Markierungsschritte erfolgten stets im Dunkeln um eine Beeinflussung der Farbstofffluoreszenz durch Tages- bzw. das künstliche Laborlicht zu verhindern.

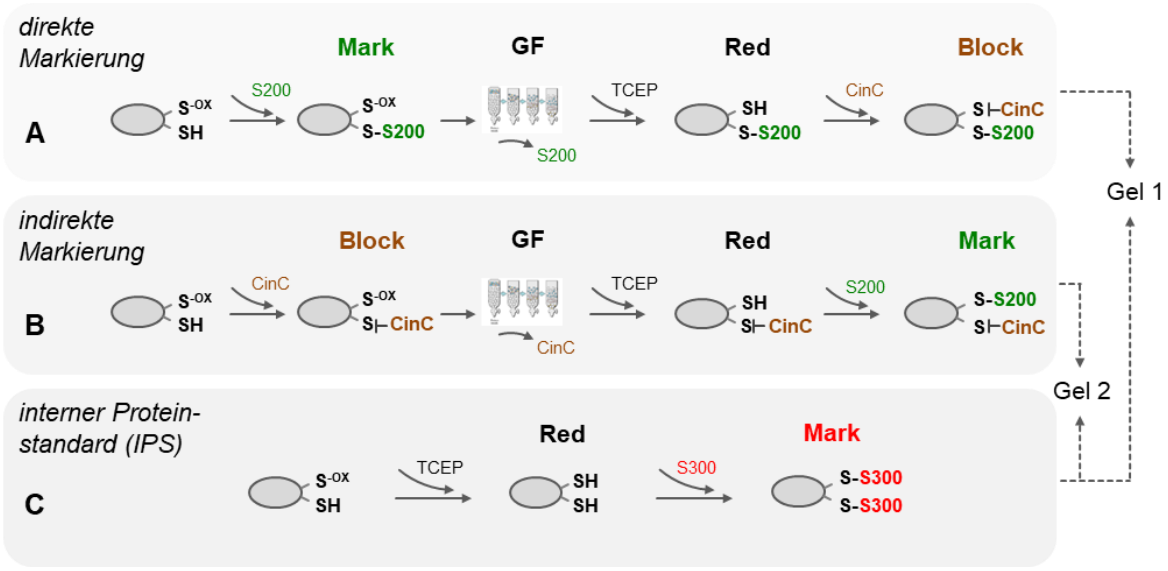

Abbildung 3-1: Schematischer Ablauf der Redox-DIGE-Markierung.

Während der Redox-DIGE-Markierung der Kolongewebelysate werden für jede Probe über zwei unterschiedliche Markierungsabläufe zwei Subproteome (2 Gele) generiert. Durch die direkte Markierung (A) werden die reduzierten/ freien Cysteinreste und mittels der indirekten Markierung (B) die oxidierten Cysteinreste adressiert. Zusätzlich wird auf jedem Gel ein interner Proteinstandard (IPS) (C) mitgeführt. Block, Blockierung; CinC, Trademark der Firma NHD; Cys, Cystein; GF, Gelfiltration; Mark, Markierung; S^{-ox}, oxidierter Cysteinrest; TCEP, Tris(2-carboxyethyl)phosphin.

Die direkte Markierung (di-M) (Abbildung 3-1 A) beginnt mit der Markierung freier bzw. reduzierter Cysteinreste mit 2 nmol des Farbstoffes S200. Dieser Ansatz wird nach Mischung und kurzer Zentrifugation bei 37 °C für 1 h inkubiert. Nachfolgend werden überschüssige Farbstoffmoleküle mittels Gelfiltration (GF) entfernt und dem Ansatz 1 nmol Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) zugegeben um oxidierte Cysteinreste zu reduzieren. Nach Mischung und Zentrifugation erfolgt ebenfalls eine Inkubation bei 37 °C für 1 h. Abschließend wurden die nun reduzierten Cysteinreste mit dem CinC™ (*Cysteine interacting compound*) blockiert. Nach Mischung und Zentrifugation wurden die Ansätze bei 37 °C für 1 h inkubiert. Das CinC™ besitzt wie die Farbstoffe eine Maleimid-reaktive Gruppe, die eine kovalente Bindung mit den reduzierten Thiolen der Proteinproben über eine Thioetherbindung eingeht. Allerdings hat das CinC™ keine fluoreszierende Eigenschaft und stört somit nicht die Detektion von S200 bzw. S300. Des Weiteren besitzen S200, S300 und CinC™ ähnlich der Farbstoffe der Minimalmarkierung eine gleiche Ladung sowie nahezu gleiche Massen, was die Ko-Migration der markierten Proben auf einem Gel ermöglicht.

Bei der indirekten Markierung (ind-M) (Abbildung 3-1 B) wurden zuerst die reduzierten Cysteinreste mit CinC™ bei 37 °C für 1 h blockiert. Anschließend erfolgte die Entfernung überschüssiger CinC™-Moleküle mittels GF sowie die Reduktion der oxidierten Cysteinreste mit 1 nmol TCEP bei 37 °C für 1 h. Die nun reduzierten Cysteinreste wurden

abschließend bei 37 °C für 1 h mit 2 nmol des S200 Farbstoffes markiert. Zur Generierung des IPS (Abbildung 3-1 C) wurde der normale Ablauf der Sättigungsmarkierung durchgeführt. Nach Reduktion der oxidierten Cysteinreste mit 1 nmol TCEP bei 37 °C für 1h erfolgte eine Markierung mit dem zweiten Fluoreszenzfarbstoff S300 bei 37 °C für 1 h. Sowohl di-M bzw. ind-M als auch der IPS wurden für jeden Durchlauf, welcher aus 12 Proben und somit 24 Redox-DIGE Gelen bestand (Tabelle 3-9; Beispiel für Selenit-supplementierte Gruppen), parallel prozessiert. Im letzten Schritt wurden allen Markierungsansätzen eine entsprechende Menge Stopp-Reagenz (di-/ind-M 1 µl; IPS 24 µl) zugegeben und die Ansätze bei 37 °C für 10 Min inkubiert.

Tabelle 3-9: Markierungsansätze für die Redox-DIGE Analyse der Selenit-supplementierten Gruppen im murinen Kolongewebe.

Gruppe	Se-Mangel		ad-Selenit		ho-Selenit	
	di-M	ind-M	di-M	ind-M	di-M	ind-M
Probenanzahl	n=4					
Proteinmenge pro Probe/ IPS	5 µg/ 5 µg					
1. Farbstoff/ CinC™	S200	CinC	S200	CinC	S200	CinC
2. Farbstoff/ CinC™	CinC	S200	CinC	S200	CinC	S200
Farbstoff IPS	S300					
Anzahl Gele	24 (pro Gel: S200/S300)					

ad, adäquat; CinC™, *Cysteine interacting compound* (Trademark der Firma NHD); di-M, direkte Markierung; ind-M, indirekte Markierung; ho, hoch; IPS, interner Proteinstandard.

Nachfolgend wurde im Verhältnis 1:1 2-fach-Puffer hinzugefügt und nach Mischung und Zentrifugation wurde dieser Ansatz für 10 Min bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die gleichmäßige Aufteilung des IPS in Reaktionsgefäße entsprechend der Gelanzahl. Folgend wurden die jeweiligen Markierungsansätze (di-M oder ind-M) hinzu pipettiert. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert oder sofort über die 2DE aufgetrennt (siehe Kapitel 3.4.3.3). Aufgrund der 7 Gruppen beim 20-wöchigen Fütterungsversuch wurden die Markierungs-ansätze für die beiden Konzentrationen einer Selenverbindung angesetzt und die Selenmangelgruppe jeweils als Bezugsgruppe gewählt. Somit wurden in drei Durchgängen die Subproteome für 4 biologische Replikate der Se-Mangel-Gruppe und für jeweils 4 biologische Replikate der ad- bzw. ho-supplementierten Selenverbindung (Selenit, Selenat oder SeMet) (Tabelle 3-9) generiert. Insgesamt wurden 72 2D-Gele für die Analyse des Einflusses der Se-Verbindungen auf den Protein-Redoxstatus im murinen Kolongewebe angefertigt.

3.4.3.2 Probenansatz für präparative Gele zur MS-Analyse

Für eine anschließende massenspektrometrische Analyse zur Identifizierung der differentiell regulierten bzw. redox-modulierten Proteine wurden parallel für beide Fluoreszenzmarkierungsansätze präparative Gele mitgeführt. Da durch die Minimalmarkierung lediglich 1-2 % der vorhandenen Lysinreste markiert werden kommt es nicht zu einer starken Veränderung der jeweiligen Masse der Proteine bzw. des Spotmusters auf dem 2D-Gel. Dadurch konnten für diesen Markierungsansatz die differentiell regulierten Proteinspots von einem Coomassie-gefärbten Gel (CCB-Färbung, siehe Kapitel 3.4.3.4) gepickt werden. Zu diesem Zweck wurde eine Mischung aller Kolongewebelysate mit insgesamt 500 µg Protein erstellt, ein entsprechendes Volumen 2x-Puffer hinzugefügt, bis zu einem Endvolumen von 340 µl mit Solubilisierungspuffer nach Rabilloud [173] (RAB) ergänzt und der isoelektrischen Fokussierung zugeführt.

RAB-Puffer: 7 M Harnstoff , 2 M Thioharnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 1 % (w/v) DTT,
0,2 M NDSB 256, 0,5 % (v/v) Ampholyte pH 3-10, Spur Bromphenolblau

Im Falle des Redox-DIGE-Experimentes beeinflussen die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (S200/ S300) bzw. CinC^{TM} sowohl die Ladung als auch die Masse der markierten Proteine. Dadurch kommt es zu einem veränderten Spotmuster, das nicht mit einem CCB-gefärbten Gel übereinstimmt. Aus diesem Grund mussten auch für den präparativen Ansatz die Proteine gesättigt mit S200 markiert werden. Hierfür wurde eine Mischung alle Kolongewebelysate mit einer Gesamtproteinmenge von 200 µg erstellt, welche 1 h bei 37 °C mit TCEP reduziert und anschließend 1 h bei 37 °C mit S200 markiert wurde. Nach der Zugabe eines entsprechenden Volumens an 2x-Puffer und der Zugabe von RAB bis zu einem Endvolumen von 340 µl wurden diese Proben ebenfalls der isoelektrischen Fokussierung zugeführt.

3.4.3.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

3.4.3.3.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF) im pH Bereich 3-10

Die isoelektrische Fokussierung ist die erste Dimension der 2DE und trennt Proteine in Abhängigkeit ihrer Ladung auf. Mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Fertig-Gelstreifen (IPG-Streifen), auf denen Ampholytmoleküle immobilisiert vorliegen, können Proteingemische über einen pH-Gradienten (in dieser Arbeit pH 3-10) getrennt werden. Nach Anlegung eines elektrischen Feldes werden die Proteine am Punkt ihrer Nettoladung Null innerhalb des pH-Gradienten fokussiert (isoelektrischer Punkt, p*I*). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten IPG-Streifen für die IEF wurden von *GE Healthcare* bezogen, waren 18 cm lang und hatten ein Beladungsvolumen von 340 µl.

3.4.3.3.1.1 IEF für die Ansätze der Minimalmarkierung und für die präparativen Ansätze

Nach der Minimalmarkierung wurden den zu trennenden Kolongewebeproben RAB-Puffer bis zum Endvolumen von 340 µl hinzugegeben. Jede Probe wurde anschließend in ein auf der Fokussierungseinheit befindlichen Fokussierungsschiffchen gegeben und der IPG-Streifen mit der Polyacrylamid-Seite zum Lysat hin hineingelegt. Die Rehydrierung der IPG-Streifen fand in dieser Variante gleichzeitig zur Probenbeladung statt. Um die IPG-Streifen vor Austrocknung zu schützen wurden diese mit 400 µl Mineralöl überschichtet und anschließend die Schiffchen mit Deckeln verschlossen.

Während der Fokussierung wurde der Stromfluss auf 50 µA/IPG-Streifen begrenzt und folgendes Programm durchlaufen:

i)	0 V	2 h
ii)	30 V	10 h
iii)	500 V	1 h
iv)	1000 V	1 h
v)	5000 V	1 h
vi)	8000 V	5 h

Bei jeder Fokussierung wurden 46 000 Vh angestrebt und bei Unterschreiten dieses Wertes wurde entsprechend nachfokussiert. Diese Methode wurde ebenfalls für die Fokussierung der präparativen Ansätze gewählt, die stets parallel auf einer zweiten Fokussierungseinheit durchgeführt wurde.

3.4.3.3.1.2 IEF für die Ansätze der Redox-DIGE

Neben dem Beladen der IPG-Steifen mit den Proteinproben parallel zu der Streifen-Rehydratisierung gibt es die Methode des *cup loadings*. Diese kann bei geringen Protein- bzw. Probenmengen (< 100 µl) eingesetzt werden. Diese Beladung der IPG-Streifen mittels *cup loading* wurde für die Fokussierung der Redox-DIGE Proben gewählt. Dafür wurden die IPG-Streifen über Nacht bei RT in 340 µl RAB-Puffer rehydratisiert und mit 400 µl Mineralöl überschichtet um eine Austrockung der Streifen zu verhindern. Nach erfolgter Quellung wurden die Streifen in den *cup loading strip holder* überführt, die Beladungs-*Cups* an der anodischen Seite der Steifen platziert, die IPG-Streifen mit Mineralöl überschichtet und die Probe in die Beladungs-*Cups* gegeben. Abschließend wurden auch die Beladungscups mit einem Tropfen Mineralöl versehen, um die Probenauftragsstelle vor Austrocknung zu schützen. Die nachfolgende Fokussierungszeit verkürzte sich im Vergleich zur anderen Beladungsvariante um die Zeit der Rehydratisierung der IPG-Streifen.

Während der Fokussierung wurde der Stromfluss auf 50 µA/IPG-Streifen begrenzt und folgendes Programm durchlaufen:

i)	30 V	1 h
ii)	500 V	1 h
iii)	1000 V	1 h
iv)	5000 V	1 h
v)	8000 V	5 h

Die fokussierten IPG-Streifen wurden anschließend entweder für die Auftrennung in der zweiten Dimension äquilibriert oder bei -20 °C gelagert.

3.4.3.3.2 Äquilibrierung der IPG-Streifen

Um eine effiziente Übertragung der Proteine nach der Fokussierung in die Gelmatrix der zweiten Dimension sicherzustellen ist es notwendig, das Puffersystem zu wechseln. Im ersten Schritt werden Sulfhydrylgruppen mit DTT reduziert (Äquilibrierungspuffer 1).

Äquilibrierungspuffer 1: 6 M Harnstoff , 50 mM Tris x Cl (pH 8,8), 30 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 1,5 % (w/v) DTT

Im zweiten Äquilibrierungsschritt wird durch eine Alkylierung der Cysteine mit Jodacetamid eine Re-Oxidation der Cysteinreste verhindert (Äquilibrierungspuffer 2).

Äquilibrierungspuffer 2: 6 M Harnstoff , 50 mM Tris x Cl (pH 8,8), 30 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 4,8 % (w/v) Jodacetamid

Des Weiteren erfolgt während der Äquilibrierung der IPG-Streifen eine Beladung der Proteine mit Natriumdodecylsulfat (SDS). Dies führt zu einem negativen Ladungsüberschuss und ermöglicht ein einheitliches Laufverhalten der Proteine im elektrischen Feld. Die Äquilibrierung erfolgte in Plexiglasröhrchen auf einem Taumelschüttler. Die Streifen inkubierten für jeweils 15 Min in Äquilibrierungspuffer 1 und nachfolgend in Äquilibrierungspuffer 2. Anschließend wurden die Streifen in 1x-SDS-PAGE-Laufpuffer bis zu Beladung auf die PA-Gele inkubiert.

3.4.3.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) von 2D-Gelen

Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgte über eine SDS-PAGE, welche von Laemmli entwickelt wurde [174] und Proteine aufgrund ihres Stoke´schen Radius bzw. Molekulargewichtes im elektrischen Feld voneinander trennt. Durch die Anlagerung von SDS während der Äquilibrierung wird der Einfluss der Ladung aufgehoben, da SDS für einen negativen Ladungsüberschuss sorgt. Dadurch wandern die SDS-Protein-Komplexe zur Anode und durchqueren dabei ein chemisch inertes Acrylamid-Bisacrylamidgel. Durch

die Quervernetzung von Acrylamid mit Bisarcyrlamid bildet sich eine Porenstruktur aus, wobei die Größe der Poren über die Konzentration von Acrylamid bzw. Bisacrylamid variierbar ist. Während der Polymerisation der Moleküle kommt es zu einer radikalischen Substitutionsreaktion wofür Ammoniumpersulfat (APS) die Startradikale liefert und N, N, N´, N´-Tetramethylendiamin (TEMED) den Katalysator darstellt.

Die 2D-Gele wurden stets parallel in einem Gießstand hergestellt, wobei die Gelkassetten eine Abmessung von 20 cm x 22 cm x 0,1 cm für analytische und x 0,15 cm für präparative Gele hatten. Das gleichzeitige Gießen der 2D-Gele ist notwendig um eine einheitliche Gelmatrix für alle durchzuführenden Einzel- bzw. präparativen Ansätze zu garantieren. Die Zusammensetzung der Gelmatrix ist in Tabelle 3-10 aufgeführt. Nach Einbringen der Gelmatrix in den Gießstand wurde durch Überschichten mit 0,1 % SDS eine glatte Geloberfläche erzeugt und nach erfolgter Polymerisation die Gele mit den äquilibrierten IPG-Streifen beladen. Zur mechanischen Befestigung der Streifen wurde eine 1,5-%gen (w/v) *low melting* Agaroselösung (in 1x SDS-PAGE-Laufpuffer/ Spur Bromphenolblau) in den Spalt der jeweiligen Gelkassette gegossen und der Streifen blasenfrei auf die Geloberfläche gebracht. Zusätzlich wurde auf der positiven Seite (vor pH 3) jedes IPG-Steifens ein mit Proteinmarker getränktes Filterpapier eingebracht.

Tabelle 3-10: Zusammensetzung der Gelmatrix für die SDS-PAGE von 2D-Gelen.

Komponente	**12,5 % T/ 2,6 % C**
Acrylamid/ N,N'-Methylenbisacrylamid (40 % w/v; 37,5:1)	520 ml
1M Tris x Cl, pH 8,8	600 ml
Glycerin	64 ml
1M $Na_2S_2O_3$	8 ml
ddH_2O	392 ml
10 % (w/v) APS	16 ml
TEMED	0,8 ml

Angaben für 12 Gele; T, Gesamtacrylamidkonzentration; C, Vernetzerkonzentration.

Nach Erstarren der Agarose wurden die Gelkassetten in die mit 1x SDS-Puffer gefüllte Laufkammer überführt und initial eine Spannung von 50 V für 5 h angelegt. Anschließend wurde der Gellauf über Nacht bei 120-160 V bis 1800 Vh erreicht waren bzw. die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte, fortgesetzt.

1x SDS-PAGE-Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS

3.4.3.4 Gelfärbung mittels kolloidalem Coomassie Brillant Blau

Die kolloidale Coomassie Färbung wurde in dieser Arbeit für die Visualisierung der Spotmuster von präparativen Gelen eingesetzt. Sie beruht auf dem Prinzip der nicht-kovalenten Anlagerung des Coomassie-Moleküls an hydrophobe Proteinseitenketten.

Hierzu wurde das Protokoll von Neuhoff und Mitarbeitern [175] modifiziert angewendet. Nach der SDS-PAGE wurden die 2D-Gele aus den Glaskassetten genommen und zweimal in ddH_2O gewaschen und anschließend über Nacht in der Coomassie-Färbelösung auf einem Taumelschüttler bei RT inkubiert.

Coomassie-Färbelösung: 10 % (w/v) Ammoniumsulfat
2 % (v/v) Phosphorsäure
20 % (v/v) Methanol
0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250

Um den Färbehintergrund zu reduzieren wurden die Gele anschließend mehrmals mit ddH_2O gewaschen und folgend bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.4.3.5 Dokumentation und Auswertung der 2D-Gele

3.4.3.5.1 Dokumentation von Coomassie-Gelen

Die Visualisierung der Proteinspots der Coomassie-gefärbten Gele erfolgte mittels eines Doppelplattformscanners mit einer Auflösung von 300 dpi im Durchlichtmodus. Die Bilder wurden mit 256 Graustufen im *tagged image file format* (tiff) generiert. Dadurch war die Kompatibilität der Bilder mit der zur Auswertung genutzten Software Delta2D (Version 4.6, Decodon GmbH, Greifswald, Deutschland) gewährleistet.

3.4.3.5.2 Dokumentation von 2D-DIGE Gelen

Analytische sowie präparative Fluoreszenzgele wurden nach der SDS-PAGE zweimal in ddH_2O für 10 Min gewaschen und anschließend für 45 Min bei RT fixiert.

Fixierlösung: 10 % Essigsäure, 40 % Ethanol

Nach mehrmaligem Waschen der Gele mit ddH_2O wurden diese mit Hilfe eines Fluoreszenzscanners visualisiert und dokumentiert. Der Scanner war mit 3 verschiedenen Lasern zur Anregung und entsprechenden Filtern für die anschließende Aufnahme der Emission der Fluoreszenzfarbstoffe ausgestattet (Tabelle 3-11).

Tabelle 3-11: Verwendete Laser und Filter zur Dokumentation von 2D-DIGE Gelen.

Fluoreszenzfarbstoff	Laser	Filter
Sci2	473 nm (blau)	LPB 510 nm
Sci3/ S200	532 nm (grün)	LPG 575 nm
Sci5/ S300	635 nm (rot)	LPR 665 nm

Die Scans erfolgten mit einer Auflösung von 100 µm und die Spannung wurde 50 V unterhalb des Sättigungslevels des jeweiligen Gels gewählt.

3.4.3.5.3 Gelanalyse

Die quantitative Auswertung der Gelbilder erfolgte mit Hilfe der Software Delta2D nach Herstellerangaben. Für die Normalisierung der einzelnen Proteinspots werden die Intensitäten der Spots auf den jeweiligen IPS Gelbildern herangezogen. Nach dem dafür notwendigen Übereinanderlegen der jeweiligen IPS-Gelbilder und der verschiedenen Gelbilder eines Geles (2 oder 3 Bilder je nach Ansatz) wurde ein Fusionsgelbild generiert, welches alle vorhandenen Proteinspots im Experiment darstellt. Auf diesem Fusionsgelbild wurden die Proteinspots editiert und anschließend auf alle Gelbilder zurückübertragen. Für die 2D-DIGE Experimente bei denen die Minimalmarkierung angewendet wurde, wurden Proteinspots als differentiell exprimiert betrachtet, deren Spotintensität um den Faktor 1,5 (erhöht oder erniedrigt) zwischen mindestens zwei der sieben Behandlungsgruppen verändert war und einen p-Wert < 0,05 aufwies (*analysis of variance*, Anova). Hinsichtlich des 2D-Redox-DIGE Experiments wurden für die Auswertung die beiden Subproteome aufeinander bezogen und dadurch der prozentuale reduzierte Proteinstatus ermittelt, der anschließend in Relation zur Se-Mangel-Gruppe betrachtet wurde. Ein p-Wert < 0,05 wurde als Kriterium für einen veränderten Redoxstatus des Proteinspots gewählt. Sowohl bei den DIGE-Experimenten als auch beim Redox-DIGE-Experiment wurden entsprechend regulierte Spots mit Hilfe des von Delta2D generierten Spotalbums visuell überprüft und anschließend für die MS-Analyse auf die präparativen Gele übertragen.

3.4.3.6 Proteinidentifizierung mittels *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

Das Prinzip der MALDI-TOF-MS wurde parallel von Karas und Hillenkamp [176] sowie Tanaka [177] entwickelt. Zu Beginn wird die zu analysierende Probe zusammen mit einer Matrix auf einem entsprechenden Träger aufgebracht, wobei diese ko-kristallisieren. Diese Kristalle werden in der Ionenquelle, die einem Vakuum unterliegt, einem Impuls kurzwelliger Laserstrahlung ausgesetzt. Die Matrix hat ein Absorptionsmaximum im Wellenlängenbereich des Lasers, wodurch der Übergang der Analyt- und Matrixmoleküle in die Gasphase (Desorption) erfolgt. Dabei kommt es zur Protonenübertragung von den Matrixmolekülen auf den Analyten, welcher ionisiert wird. Nachfolgend werden die ionisierten Analytmoleküle durch das Anlegen von mehreren tausend Volt beschleunigt und in einem Flugzeitanalysator (*time of flight*, TOF) nach ihrem Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) getrennt und detektiert (Abbildung 3-2).

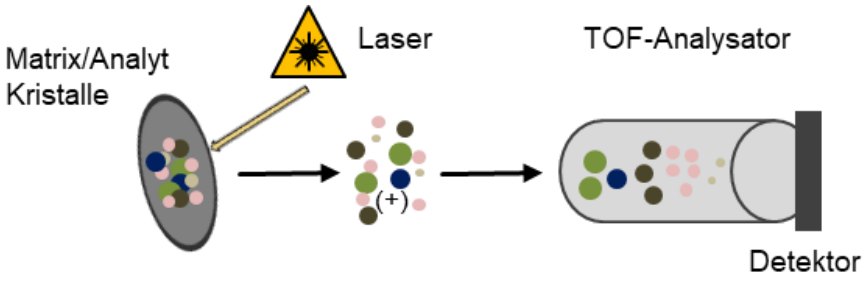

Abbildung 3-2: Schematische Darstellung des MALDI-TOF Massenspektrometers.

Durch den Impuls eines Lasers kommt es zur Desorption der Matrix- und Analytkristalle, wodurch Protonen auf die Analyte übertragen, die somit ionisiert (+) werden. Anschließend werden die Analyte im TOF-Analysator nach m/z getrennt und detektiert. Modifiziert nach [178].

Die jeweilige Masse der Analyte wird über den Vergleich mit Kalibrierungssubstanzen bestimmt.

3.4.3.6.1 Entfärbung, in-Gel-Verdau und Auftragen von Proteinspots für die MS-Analyse

Differentiell exprimierte Proteinspots wurden manuell aus den Coomassie-gefärbten 2D-Gelen mit einem Ausschneidegerätes GelPal ausgestanzt und in eine 96-Loch Platte der Firma Intavis übertragen (*reaction plate*). Das Ausschneiden der Proteinspots aus den fluoreszenz-gefärbten präparativen Gelen der Redox-DIGE-Experimente erfolgte mit Hilfe eines *Spot Hunters* mit integrierter Fluoreszenz-Detektionseinheit. Diese Spots wurden ebenfalls in eine 96-Loch *reaction plate* übertragen. Die *reaction plates* wurden anschließend in einen *Digester* überführt, worin das automatische Entfärben, der in-Gel-Verdau sowie das Auftragen auf die MALDI-TOF-MS Platte stattfand (Tabelle 3-12). Während des Auftragens der Peptidlösung auf die MALDI-TOF-MS Platte wurden Millipore® Ziptips (C18) benutzt, die eine Aufreinigung und Konzentrierung der Peptidlösung ermöglichen und somit zu einer höheren Qualität der resultierenden Daten führen.

Tabelle 3-12: Ablauf der automatisierten Entfärbung, Verdauung und des Aufbringen der Proteinspots auf die MALDI-Platte.

Entfärbung und in-Gel Verdauung					
Schritt	Prozess	Zeit; Temp.	Puffer	Volumen (µl)	Wdh.
1	Inkubation	10 Min; RT	50 % ABC/ACN	60	2
2	Inkubation	10 Min; RT	50 mM ABC	60	2
3	Inkubation	10 Min; RT	25 mM ABC	60	1
4	Inkubation	10 Min; RT	100% ACN	60	2
5	Warten	10 Min; RT	ohne	0	1
6	Inkubation/ Warten	3 h; 37°C	Trypsin*	15	1
7	Warten	3 h; 37°C	Wasser	10	1
8	Aliquotieren	RT	1 % TFA	10	1
9	Inkubation	20 Min; RT	25 mM ABC	20	1
10	Inkubation	20 Min; RT	100 % ACN	20	1
11	Warten	10 Min; RT	ohne	0	1
12	Überführen in *elution plate*				
Auftragen auf MALDI-TOF MS Platte mit *ZipTips*®					
Schleife**	Prozess		Puffer	Volumen (µl)	
L1	*Tip*-Waschung		0.1 % TFA; 100% ACN	20; 20	
L2	*Tip*-Beladung		Probe	50	
L3	*Tip*-Elution auf *target*		100% ACN; Matrix50% ACN	20; 1	
L4	Azetonspülung		Azeton	10	
L5	Spülung Nadel		0.1 % TFA	50; 250***	

*0.008 µg/µl (25 mM ABC, 400 µM $CaCl_2$); ** jede Probe durchläuft diese Schleife; ***innen; außen; Temp, Temperatur; ABC, Ammonium Bikarbonat; ACN, Acetonitril; TFA, Trifluoressigsäure.

3.4.3.6.2 Massenspektrometrische Analyse

Die massenspektrometrische Proteinidentifizierung wurde mittels Peptidmassenfinger-abdruck (PMF) durchgeführt. Dieser beruht auf der Bestimmung der Massen von möglichst vielen proteolytischen Spaltprodukten eines Proteins. Die im Experiment entstandenen Massen werden anschließend *in silico* mit einem virtuellen Fingerabdruck verglichen, welcher durch den theoretischen Verdau des aus dem offenen Genleserasters abgeleiteten Proteins entsteht [179]. Die PMF-Analysen wurden an einem *ultrafleXtreme*™ MALDI-TOF-MS im positiven Reflektormodus mit einer Beschleunigungsspannung von 25 kV durchgeführt. Entstandene Spektren wurden extern mit dem *Peptide Calibration Standard II* für einen Massenbereich von ca. 700 bis 3500 Da kalibriert (Tabelle 3-13).

Tabelle 3-13: Zur Kalibrierung eingesetzte Peptide und deren [M+H]+ m/z Werte.

Peptid	[M+H]+ monoisotopische Masse	[M+H]+ durchschnittliche Masse
Bradykinin1-7	757.3992	757.86
AngiotensinII	1046.5418	1047.19
AngiotensinI	296.6848	1297.49
SubstanceP	1347.7354	1348.64
Bombesin	1619.8223	1620.86
ACTH clip1-17	2093.0862	2094.43
ACTH clip18-39	2465.1983	2466.68
Somatostatin28	3147.4710	3149.57

Die Proteine wurden unter Benutzung der MASCOT Suchmaschine (Matrix Science, Dauhaim, USA) im PMF-Modus identifiziert. Für den Vergleich der experimentellen mit den theoretischen Massen fand die SwissProt-Datenbank Anwendung. Während der MS-Analyse der 2D-DIGE-Experimente wurden folgende Suchparameter gewählt:

i) *mus musculus* Sequenzen
ii) feste Modifikation: Carbamidomethylierung von Cysteinen
iii) variable Modifikation: Oxidation von Methioninen
iv) Spaltungsenzym: Trypsin
v) eine versäumte Spaltungsstelle erlaubt
vi) Massentoleranz (monoisotopisch): 50.0 ppm

Für die MS-Analyse des Redox-DIGE-Experimentes musste wie in Kapitel 3.4.3.2 beschrieben eine saturierende Markierung mit S200 durchgeführt werden. Hierfür wurde den Suchparametern eine feste Modifikation der Cysteinreste mit S200 statt Carbamidomethyl hinzugefügt. Wenn der resultierende MOWSE Score > 55 war wurden die Proteine als identifiziert angesehen. Nachfolgende Klassifizierungs- bzw. Interaktionsanalysen wurden mit der PANTHER GO Software [180] und STRING durchgeführt [181].

3.5 Immunologische Methoden

3.5.1 Western Blot

3.5.1.1 SDS-PAGE von 1D-Gelen

Die SDS-PAGE der 1D-Gele wurde nach der Methode von Laemmli durchgeführt [174] (siehe Kapitel 3.4.3.3.3). Die dafür eingesetzten Polyacrylamid (PAA)-Gele bestanden aus einem Trenngel zur Auftrennung der Kolonproben nach ihrem Molekulargewicht und einem großporigeren Sammelgel zum Konzentrieren der Proteine zu einer schmalen Bande. Im Sammelgel wurde ein Probenkamm mit einpolymerisiert und die entstandenen Taschen zur

Beladung der Gele verwendet. In dieser Arbeit wurden in Abhängigkeit des Molekulargewichtes des Zielproteins 10%ge oder 12%ge Trenn-Gele angefertigt. In Tabelle 3-14 ist exemplarisch der Ansatz für ein 10%ges Gel mit Sammelgel aufgezeigt.

Tabelle 3-14: Zusammensetzung eines 1D-SDS-PAGE Geles.

	Trenngel 10%ig [ml]	Sammelgel 5%ig [ml]
Acrylamid 40%	2,5	0,5
ddH_2O	4,8	2,4
1,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	-	1
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	2,5	-
10 % (w/v) APS	0,1	0,04
10 % (w/v) SDS	0,1	0,04
TEMED	0,004	0,006

Pro Kolongewebeprobe wurden 30 µg Protein (DIGE-Pufferproben) eingesetzt. Eine entsprechende Menge 4-fach-Probenpuffer wurde hinzugefügt und einige Minuten auf Eis inkubiert. Eine 5-minütige Erhitzung der Proben bei 95 °C wurde nicht durchgeführt, da der in den DIGE-Lysepuffern enthaltene Harnstoff erhitzt über eine Temperatur von 37 °C zu Carbamylierungen von Proteinen führt. Auf jedem Gel wurde ein Proteinmarker mitgeführt um detektierte Proteinbanden mit dem Molekulargewichtes des Zielproteins abzugleichen.

4-fach-Probenpuffer: 29,07 g/l Tris (pH 8,0), 4 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerin, 0,004 % (w/v) Bromphenolblau, 4 % (v/v) β-Mercaptoethanol (β-ME)

Die Proben wurden anschließend beginnend mit einer Einfahrspannung von 50 V und folgend mit 80 V, bis zum Zeitpunkt an dem die Lauffront das Gelende erreicht hatte in einer SDS-PAGE Minigelkammer getrennt.

3.5.1.2 Immunoblot-Analysen

Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Proteine auf Nitrocellulosemembranen (GE Healthcare) transferiert. Der Blot erfolgte in einer Tank-Blot Apparatur die mit Transferpuffer gefüllt war für ca. 18 h bei 100 mA.

Transferpuffer: 150 mM Glycin, 20 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol

Nach dem Transfer wurden die Membranen mit Blockierungspuffer für mindestens eine Stunde inkubiert um die nicht besetzten Membranbindungsstellen zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen in Tris-gepufferter Salzlösung versetzt mit Tween 20 (TBS-T Puffer) erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in einer entsprechenden Verdünnung (

Tabelle 3-15) über Nacht bei 4 °C in 1-fach TBS-T-Puffer mit 5 % bovinem Serumalbumin (BSA).

1-fach TBS-T-Puffer:	150 mM NaCl, 10 mM Tris x Cl pH 8,8, 0,1 % Tween 20
Blockierungspuffer:	1-fach TBS-T, 5 % (w/v) Magermilchpulver

Tabelle 3-15: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper.

Antigen	Wirt	Hersteller (Artikelnummer)	Verdünnung
Primärantikörper			
aTUB	Maus	Sigma-Aldrich (#T9026)	1:1000
GAPDH	Kaninchen	Cell Signaling Technology (CST), Danvers, USA (#2118)	1:2000
PRDX 6	Kaninchen	Abcam plc, Cambridge, UK (#ab133348)	1:1000
CLCA1	Kaninchen	Abcam (#ab180851)	1:2000
COF1	Kaninchen	CST (#5175)	1:1000
LMNA	Kaninchen	Abcam (#ab108922)	1:1000
CaM	Kaninchen	Abcam (#ab45689)	1:1000
ANXA2	Kaninchen	Abcam (#ab178677)	1:1000
GPx2	Zur Verfügung gestellt von Regina Brigelius-Flohé/ Anna P. Kipp (DIfE, Nuthetal, Deutschland) [182]		1:5000
Sekundärantikörper			
Kaninchen-IgG	Ziege	CST (#7074)	1:1000
Maus-IgG	Pferd	CST (#7076)	1:1000

aTUB, alpha-Tubulin; ANXA2, Annexin A2, CaM, Calmodulin; CLCA1, *Calcium-activated chloride channel regulator 1;* COF1, Cofilin-1; GAPDH, Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase; GPx2, Glutathionperoxidase 2; IgG, Immunglobulin G; LMNA, Prelamin A/C; PRDX 6, Peroxiredoxin 6.

Um nicht gebundene Antikörpermoleküle zu entfernen wurden die Blots dreimal je 5 Min in 1-fach TBS-T-Puffer gewaschen und anschließend mit einem entsprechenden sekundären Antikörper, verdünnt in 1-fach TBS-T-Puffer (5 % Milchpulver) bei RT für 1 h inkubiert. Vor der Immundetektion wurden die Blots dreimal mit TBS-T gewaschen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Zur Detektion wurden Sekundärantikörper gekoppelt mit einer Peroxidase (*horse raddish peroxydase*, HRP) eingesetzt. Dabei kommt es nach Zugabe eines Substrates zu einer Chemolumineszenz-Reaktion. Diese Lichtemission wurde bei 425 nm gemessen (LAS 3000). Als Ladekontrolle dienten GAPDH oder alpha-Tubulin. Die quantitative Auswertung erfolgte mit der Software VisionCapt (Vilber Lourmat SAS, Frankreich).

3.5.2 Redox Blot-Analysen

Zur Validierung des Redoxstatus des PRDX6 wurden die Proteine auf einem 1D-Gel unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Hierfür wurden Lysate der Kolonproben in einem DIGE-Puffer (pH 7,5) mit dem Zusatz von *N*-Ethylmaleinimid (NEM, 100 mM) zur Blockierung freie Cysteinreste hergestellt und für die sieben Gruppen Pools generiert. Nach einer Acetonfällung der Proteine um überschüssiges NEM zu entfernen, wurde die Proteinkonzentration wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben bestimmt.

Schritte der Acetonfällung von Proteinen:

(i) Proteinfällung in 80 % Aceton bei – 20 °C über Nacht
(ii) Pelletierung mittels Zentrifugation (5 Min, 13000 rpm)
(iii) Zweimaliges Waschen mit 100 % Aceton (-20 °C) und Zentrifugation (13000 rpm)
(iv) Trocknung des Pellets mit anschließender Re-Suspension im DIGE-Puffer (pH 7,5)

25 µg Protein pro Pool wurden reduzierend und nicht-reduzierend, was durch die Zugabe oder das Fehlen von β-Mercaptoenthanol (β–ME) im Laemmli-Puffer erreicht wurde, mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte ein Western Blot wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben mit Verwendung von anti-PRDX6 als Primärantikörper. In Abbildung 3-3 ist neben dem schematischen Ablauf dieses Ansatzes ein theoretisches Blotergebnis aufgezeigt.

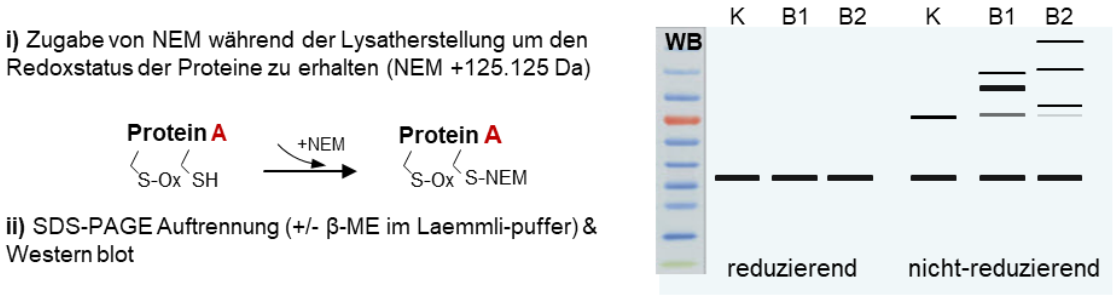

Abbildung 3-3. Strategie zur Validierung des Redoxstatus von PRDX6.

Zur Validierung des Redoxstatus von Zielproteinen wurden mögliche Dimerbildungen (homo/ hetero) des Proteins über Disulfidbrücken durch reduzierte versus nicht-reduzierte Bedingungen mittels Redox-Blot visualisiert. B-ME, β-Mercaptoenthanol; B1/2, Behandlung 1/2; K, Kontrolle; NEM, *N*-Ethylmaleinimid; S-Ox, reversible oxidiertes Cystein; TCEP, Tris(2-carboxyethyl)phosphin.

Für diesen Validierungsansatz könnten sich auf der nicht-reduzierten Blotseite bei höheren MW zusätzliche Banden zeigen, was auf eine mögliche Interaktion des PRDX6 mit anderen Proteinen über Disulfidbrücken hinweist. β–ME reduziert Disulfidbrücken, wodurch Proteinbanden bei den Kolongewebepools die vorher reduziert wurden, nicht zu erwarten sind.

3.6 Validierung relevanter Zielstrukturen mittels zellbiologischer Methoden

3.6.1 Kultivierung und Lagerung humaner Kolonkarzinom-Zelllinien

Für die Validierung einiger ausgewählter Zielstrukturen wurden zusätzlich Zellkulturexperimente mit humanen Kolonkarzinom-Zelllinien (Tabelle 3-16) durchgeführt.

Tabelle 3-16: Verwendete humane Kolonkarzinom-Zelllinien.

Zelllinie	ATCC-Nr.	Beschreibung
HT-29	HTB-38™	adhärent wachsend; epithelial; kolorektales Adenokarzinom
HCT116	CCL-247™	adhärent wachsend; epithelial; kolorektales Karzinom
Colo320	CCL-220™	locker adhärent wachsend; kolorektales Adenokarzinom

ATCC, *american tissue culture collection*.

Die verwendeten Zelllinien wurden in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO_2-Partialdruck im Inkubator in Gewebekulturflaschen mit 75 cm^2 Fläche kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium (HT-29/ HCT116: DMEM + 10 % FKS, 1% Penizillin/ Streptomyzin; Colo320: RPMI + 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 1% Penizillin/ Streptomyzin) gewechselt bzw. die Zellen mittels Trypsin abgelöst, um diese in Zellkulturplatten oder –flaschen auszusäen. Dazu wurde nach Entfernung des Zellkulturmediums die Kulturflasche einmal mit PBS gewaschen und 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung hinzugeben. Nach Ablösen der Zellen wurde durch Zugabe von 3 ml komplettem Medium die proteolytische Aktivität des Trypsins kompetitiv gehemmt und die Zellen in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Zentrifugation der Zellen erfolgte für 5 Min bei 300 g und das entstandene Zellpellet wurde im Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellen entweder in einem gewählten Verhältnis (HT-29 1/3-1/5; HCT116 1/5-1/10; Colo320 1/3-1/5) in eine frische Zellkulturflasche überführt oder entsprechend des Versuchsansatzes mit einer bestimmten Zellzahl in Zellkulturplatten ausgesät. Zur dauerhaften Konservierung der Zellen wurden diese nach Zentrifugation in Einfriermedium (90 % (v/v) FKS, 10 % (v/v) DMSO) resuspendiert, auf Kryogefäße verteilt und in spezielle Einfrierboxen, gefüllt mit Isopropanol zum langsamen Einfrieren bei -80 °C eingefroren. Nach 24 h wurden die Kryogefäße von -80 °C auf -150 °C überführt. Zellpellets beliebiger Zellzahl für RNA-Extraktion wurden durch Ablösen der Zellen mit Trypsin, zweimaligem Waschen mit PBS und anschließendem Einfrieren bei -80°C gewonnen. RNA-Isolation, cDNA-Synthese sowie die qPCR-Experimente wurden wie in Kapitel 3.3 beschrieben durchgeführt. Für die Proteinextraktion wurden die Zellkulturschalen zweimal mit PBS gewaschen, anschließend ein entsprechendes Volumen des RIPA-Lysepuffers hinzugegeben und die Zellkulturschalen direkt bei -80°C eingefroren.

RIPA-Puffer: 50mM Tris, 150mM $NaCl_2$, 0.5% DOC, 1% NP-40, 0.1% SDS, Protease und Phosphatase Inhibitor

Zur Gewinnung der Proteinlysate wurden die Zellkulturschalen auf Eis aufgetaut und die Lysate in Reaktionsgefäße überführt. Nach einer Ultraschallbehandlung (5 Zyklen á 0,5 Sekunden, 70%ige Geräteleistung) erfolgte die Zentrifugation der Zelltrümmer für 30 Min bei 13000 rpm und 4°C. Der entstandene Überstand würde anschließend abgenommen und bei -80°C für spätere Analysen gelagert. Die Proteinkonzentration wurde wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben bestimmt.

3.6.2 Proliferations- und Zellviabilitätbestimmung

Die Untersuchung des Proliferationsverhaltens der Zellen erfolgte durch die Messung des Umsatzes des Tetrazoliumsalzes XTT (Natrium-3`-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis-(4-methoxy-6-nitro)-benzenschwefelsäurehydrat) zum wasserlöslichem Formazan (*Cell proliferation kit II*, Roche). Der Umsatz des XTT wird durch mitochondriale Dehydrogenasen unter NADH-Verbrauch katalysiert. Damit können durch diesen Test auch Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität der Zellen geführt werden. Für den XTT-Test wurden 5 x 10^3 Zellen/ Loch in eine 96-Lochplatte in Triplikaten ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit den Se-Verbindungen in folgenden Konzentrationen behandelt:

Selenit: 0,5 µM; 1,0 µM; 2,5 µM; 5 µM; 10µM; 15 µM
Selenat: 1,0 µM; 2,5 µM; 5µM; 10 µM; 25µM; 50µM
SeMet: 5µM; 10µM; 25µM; 50 µM; 100 µM; 200µM

Nach Ablauf einer Behandlung mit den Selenverbindungen für 24 h wurden pro Loch 50 µl XTT-Reagenz zugegeben und für mindestens 4 h bei 37°C inkubiert. Die Detektion erfolgte an einem Mikroplatten-Messsystem (Tecan) bei einer Wellenlänge von 490 nm, und zusätzlich wurde eine Referenz bei der Wellenlänge 630 nm bestimmt. Der Referenzwert jedes Lochs wurde anschließend vom Messwert abgezogen und die Werte relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.

Zusätzlich zum XTT-Test wurde der ATP-Test zur Bestimmung der Zellviabilität in Abhängigkeit zu den Behandlungen mit den Se-Verbindungen angewendet. Bei diesem Test (*CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*, Promega GmbH) wird der Gehalt an ATP bestimmt, der direkt proportional zur Zellzahl ist. Hierfür wurden ebenfalls 5 x 10^3 Zellen/ Loch in eine 96-Lochplatte ausgesät und nach 24 h erfolgte die Behandlung mit den Se-Verbindungen für 24 h bzw. 48h. Zur Bestimmung des ATP-Gehalts wurden nach den zu untersuchenden Zeiträumen das Medium abgesaugt, 100µl des ATP-Reagenz (1:2 mit PBS verdünnt) in jedes Loch gegeben und für 10 Min (RT, dunkel) inkubiert. Anschließend wurden die Proben in eine weiße 96-Lochplatte übertragen und die Lumineszenz an einem Luminometer gemessen.

3.7 Statistische Auswertung

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Statistik Programm SPSS® (*Statistical Package fort he Social Science*, Version 25, IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland). Die Experimente wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet. Zu Beginn wurde die Normalverteilung der Werte mit dem Shapiro-Wilk-Test ($p > 0,05$) und deren Varianzhomogenität mit Hilfe des Levene-Test´s überprüft. Bei gegebener Varianzhomogenität ($p > 0,05$) wurden die signifikanten Gruppenunterschiede mit dem LSD (*least significant difference*)-Test ermittelt. Wenn keine Varianzhomogenität vorlag wurden die Signifikanz der Unterschiede mit dem Games-Howell-Test generiert ($p < 0,05$). Die Werte sind als Mittelwert (MW) ± *Standard Error of Mean* (SEM) dargestellt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Identifizierung neuer Se-regulierter Proteine mittels 2D-DIGE in murinem Kolongewebe

Zur Identifizierung neuer Se-regulierter Proteine im murinen Kolongewebe wurde nach eine 20-wöchigen Fütterung mit den drei Se-Verbindungen Selenit, Selenat und SeMet in zwei Konzentrationen (ad, 150 µg Se/ kg Diät; ho, 750 µg Se/ kg Diät) die Gel-basierte Proteomtechnik der 2D-DIGE in Verbindung mit MALDI-TOF-MS angewendet. Nach Auswertung der insgesamt 16 fluoreszenz-markierten 2D-Gele konnten insgesamt 825 distinkte Proteinspots detektiert werden. Von denen waren 40 Proteinspots signifikant differentiell exprimiert waren (1,5-fach Hoch- oder Herunterregulation, p-Wert < 0,05). Anschließend konnten 23 dieer 40 Proteinstrukturen eindeutig mittels MALDI-TOF MS identifiziert werden (Abbildung 4-1; Tabelle 4-1).

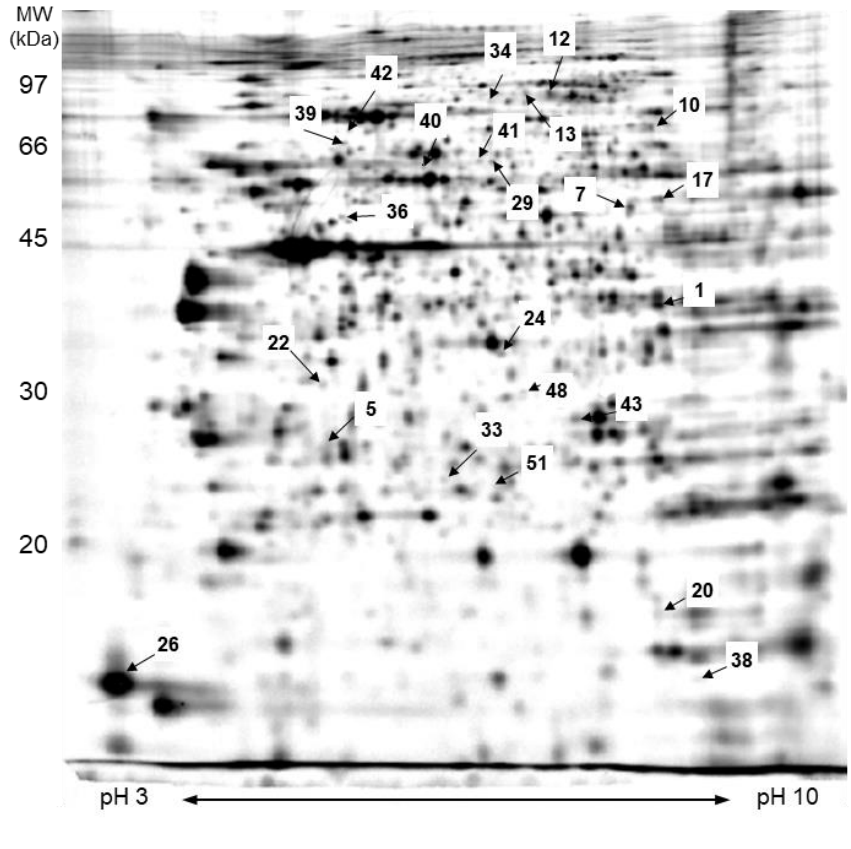

Abbildung 4-1: Differentiell exprimierte Proteine in murinem Kolongewebe nach Se-Supplementierung.

Darstellung der signifikant differentiell exprimierten Proteinspots (Probe: Se-Mangel), welche wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben selektiert und identifiziert wurden (siehe auch Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: Eine Supplementierung mit verschiedenen Selenverbindungen beeinflusst das Proteom von murinem Kolongewebe.

Nr	Proteinname	Gen	Uniprot ID	Masse (kDa)	pI	Score	passende Peptide	Sequenzabdeckung (%)	Selenit		Selenat		SeMet	
									ad	ho	ad	ho	ad	ho
	Antioxidative Aktivität (GO:0016209)													
38	**Peroxiredoxin-5, mitochondrial (PRDX5)**	Prdx5	P99029	22.23	9.10	78	8	41	0.90	1.14	0.48	0.77	0.62	0.90
	Ligandbindung/ -interaktion (GO:0005488)													
1	**Annexin A2 (ANXA2)**	Anxa2	P07356	38.94	7.55	133	17	52	1.03	1.03	0.87	0.69	0.78	0.72
5	**Calpain small subunit 1 (CSS1)**	Capns1	O88456	28.56	5.41	59	9	41	1.48	4.36*	2.02	0.83	1.59	2.91
10	**Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (hnRNP L)**	Hnrnpl	Q8R081	64.55	8.33	74	13	19	1.04	0.93	0.87	0.84	0.68	0.73
39	**Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K)**	Hnrnpk	P61979	51.23	5.39	56	11	22	1.00	0.73	0.75	0.78	0.89	0.65
20	**Cofilin-1 (COF1)**	Cfl1	P18760	18.78	8.22	107	9	46	1.03	1.13	1.23	1.67*	1.20	1.53*
29	**Coronin-1A (COR1A)**	Coro1a	O89053	51.64	6.05	61	9	18	1.07	1.58	1.90	0.90	1.03	1.21
42	**Coronin-1B (COR1B)**	Coro1b	Q9WUM3	54.51	5.54	85	13	20	1.55	0.85*	0.94	0.99	0.86	0.71
26	**Calmodulin (CaM)**	Calm1	P62204	16.83	4.09	67	7	42	0.89	0.75	0.55	0.62	0.71	0.74
33	**Growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2)**	Grb2	Q60631	25.34	5.89	72	12	36	1.48	1.14	1.37	1.13	1.81	1.25*
34	**Serum albumin (ALBU)**	Alb	P07724	70.70	5.75	65	13	26	1.09[a]	1.26	1.30	1.27	1.61[b]	1.34
	Katalytische Aktivität (GO:0003824)													
7	**6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (6PGD)**	Pgd	Q9DCD0	53.73	6.81	65	15	32	0.75[a]	0.77	0.94	0.73	1.34[b]	0.87*
36	**Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial (QCR1)**	Uqcrc1	Q9CZ13	53.45	5.81	215	26	45	1.22	1.41	2.55	0.32*	1.93	0.53
40	**Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic (HMG-CoA S1)**	Hmgcs1	Q8JZK9	58.16	5.65	64	10	20	0.73	1.03	0.91	0.66	0.80	0.69
17	**Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial (HMG-CoA S2)**	Hmgcs2	P54869	57.30	8.65	95	20	30	1.23	0.51*	0.95	1.02	1.02	1.20
24	**3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST)**	Mpst	Q99J99	33.23	6.11	97	9	22	1.07	0.80	1.52	1.14*	1.38	0.84*
41	**Thioredoxin reductase 1 (TXNRD1)**	Txnrd1	Q9JMH6	68.24	7.42	62	10	22	1.09	1.14	1.55	1.26	0.98	0.91
43	**Carbonic anhydrase 2 (CA-II)**	Ca2	P00920	29.13	6.49	57	8	41	1.90	1.36	1.91	1.13*	1.37	0.97
48	**Carbonyl reductase [NADPH] 3 (CBR3)**	Cbr3	Q8K354	31.33	6.15	100	12	50	1.15	0.87	1.16	0.59*	1.29	0.79
51	**Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 14B (ABHD14B)**	Abhd14b	Q8VCR7	22.55	5.82	58	7	42	1.95	3.03*	2.33	3.10	2.33	3.09
	Strukturmolekül (GO:0005198)													
13	**Prelamin-A/C (LMNA)**	Lmna	P48678	74.48	6.54	89	19	32	1.50	2.23*	1.50	1.50	1.85	1.86
22	**Actin, gamma-enteric smooth muscle (ACTH)**	Actg2	P63268	42.25	5.31	56	8	19	0.99	0.48*	0.90	0.67	0.95	0.61*
	Transporter (GO:0005215)													
12	**Calcium-activated chloride channel regulator 1 (CLCA1)**	Clca1	Q9D7Z6	100.8	5.67	107	19	23	1.26	1.69	1.17	1.11	1.34	1.48

Werte sind dargestellt als Mittelwerte (n=4) im Verhältnis zur Se-Mangel-Gruppe. Rot/grün markierte Boxen zeigen signifikant hoch-/ herunterregulierte Proteine im Verhältnis zur Se-Mangel Gruppe auf. Werte gekennzeichnet mit * stellen signifikante Unterschiede der hi-Selengruppe im Vergleich zur korrespondierenden ad-Selengruppe dar ($p < 0,05$; ANOVA). ad, adäquat (150 µg Se/kg Diät); ho, hoch (750 µg Se/kg Diät).

Bei zwei Proteinspots kam es zur Identifizierung von mehreren Proteinidentitäten, sodass diese von den nachfolgenden Analysen ausgeschlossen wurden. Die identifizierten Proteine sind in Tabelle 4-1 aufgelistet.

Nachfolgend wurden die identifizierten Proteine zum einen entsprechend ihrer molekularen Funktion (Abbildung 4-2 A) und zum anderen nach ihrer Beteiligung an biologischen Prozessen (Abbildung 4-2 B) mittels der *Gene Ontology* (GO) Einstufung nach PANTHER [180] klassifiziert.

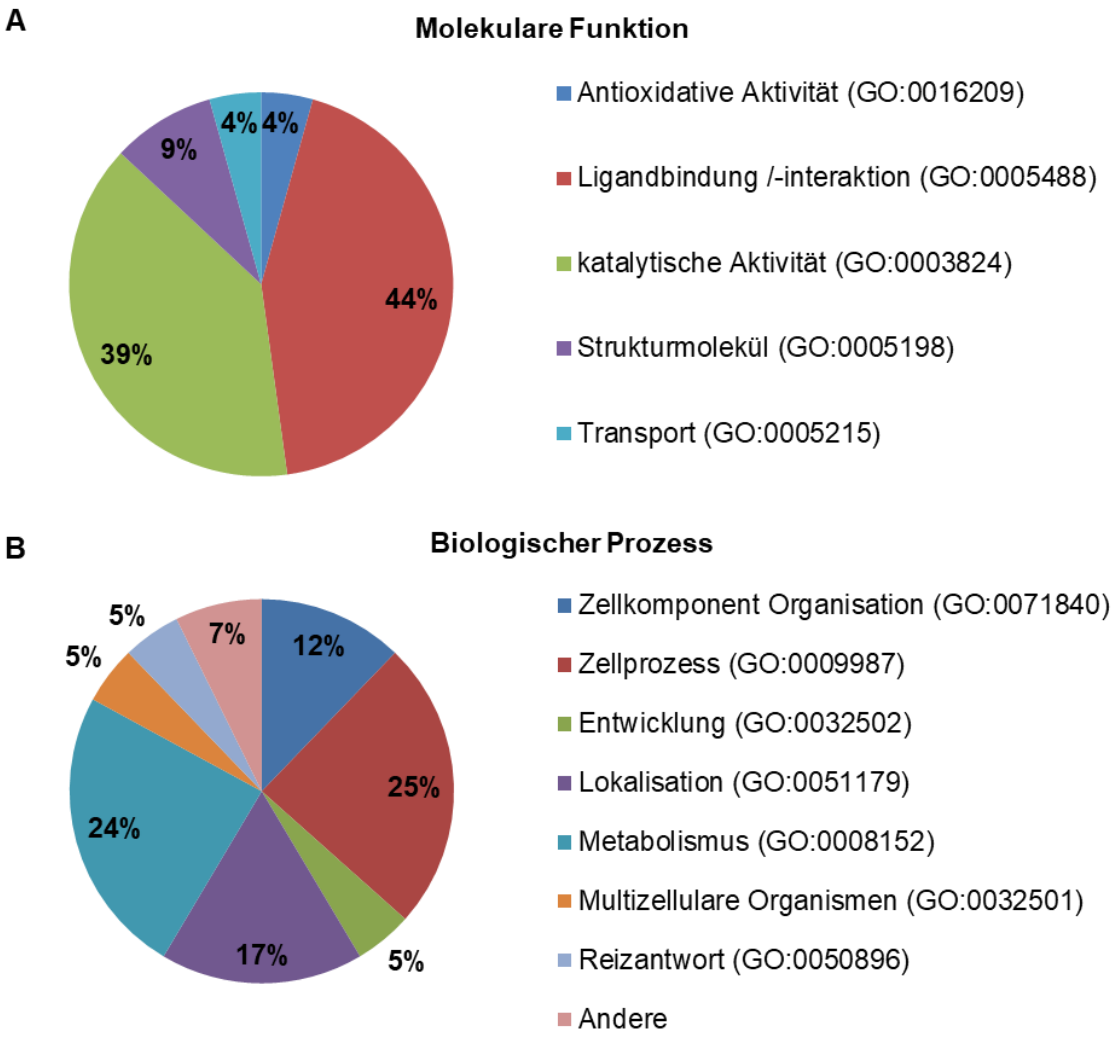

Abbildung 4-2: Klassifizierung differentiell durch Se-Supplementierung exprimierter Proteine im murinen Kolongewebe.

Klassifizierung der signifikant differentiell exprimierten Proteinspots des murinen Kolongewebes nach ihrer molekularen Funktion (A) und deren Beteiligung an biologischen Prozessen (B). Diese Klassifizierung wurde mit Hilfe des PANTHER.org Softwarewerkzeuges erstellt. Unter dem Begriff „Andere“ wurden die GO-Gruppen Biologische Regulation (GO:0065007), Immunsystem (GO:0002376) und Fortbewegung (GO:0040011) zusammengefasst.

Hinsichtlich der molekularen Funktionen wurden insgesamt 44 % der identifizierten Proteine zur Gruppe der Ligand-bindenden Proteine eingeordnet, gefolgt von Proteinen mit

katalytischen Aktivitäten (39%) oder der Funktion als Strukturmolekül (9%). Bezüglich der biologischen Prozesse wurden die meisten Proteine in die GO-Gruppe Zellprozesse (25%) klassifiziert, gefolgt von Proteinen beteiligt am Metabolismus (24%) und der Lokalisation (17%). Neben der Klassifizierung wurden die identifizierten Proteine auch hinsichtlich ihrer Interaktion untereinander betrachtet (Abbildung 4-3 A), wobei das Netzwerk mittels STRING [181] generiert wurde. Hierbei zeigte sich, dass Proteine klassifiziert in die Gruppe mit Ligand-bindenden Eigenschaften (Abbildung 4-2 A) auch miteinander interagieren. Dazu zählen *calpain small subunit 1* (CSS1), Cofilin-1 (COF1), Calmodulin (CaM) sowie Coronin ((COR)1A) und COR1B. Interessanterweise waren die Isoformen von Coronin (COR1A und 1B) in ihrer Expression durch die Se-Supplementierung unterschiedlich reguliert (Abbildung 4-3 B, Tabelle 4-1).

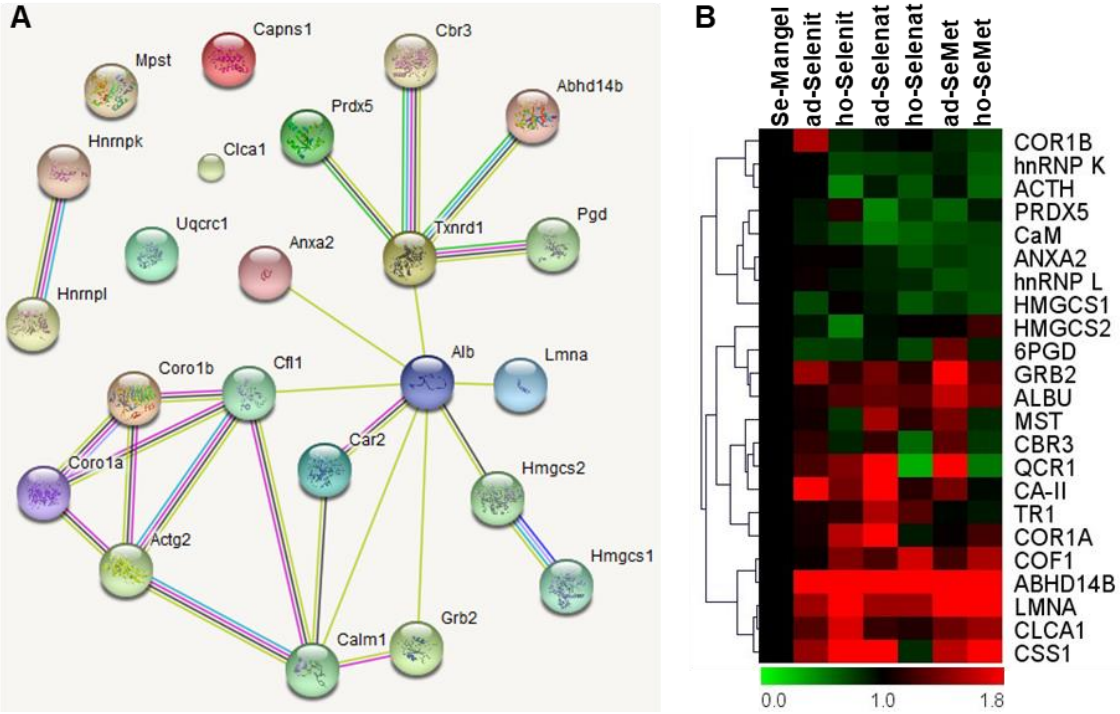

Abbildung 4-3: Interaktionsnetzwerk differentiell exprimierter Proteine im murinen Kolongewebe.

Das Interaktionsnetzwerk (A) der signifikant nach Se-Supplementierung differentiell exprimierten Proteine des murinen Kolongewebes wurde mit STRING generiert und die Heatmap (B) unter Verwendung des *MultiExperiment Viewer* (*MeV, The Institute for Genomic Research* (TIGR)).

Während die Proteinmenge an COR1B durch SeMet- und ho-Selenit-Supplementierungen im Vergleich zum Se-Mangel herunterreguliert wurde führte die Supplementierung mit ad-Selenat und ho-Selenit zu einer erhöhten Proteinmenge von COR1A im Vergleich zur Se-Mangel-Gruppe. Neben den Isoformen des Coronin wurden in zwei weiteren Fällen Isoformen eines Proteins durch die Se-Supplementierungen beeinflusst, wie dem *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L* (HnRNP L) und hnRNP K sowie die

cytoplasmatic hydroxymethylglutaryl-CoA synthase 1 ((HMG-CoA) S1) und dessen mitochondriale Form HMG-CoA S2. Die Proteinmenge beider hnRNP Isoformen wurde durch ho-SeMet-Supplementierung im Vergleich zur Se-Mangel-Gruppe signifikant herunterreguliert, während die Supplementierung mit Selenit bzw. Selenat die Proteinmenge der hnRNP Isoformen nicht beeinflusste. Des Weiteren wurde die Proteinmenge der HMG-CoA S1 durch eine ho-Selenate- und ho-SeMet-Supplementierung im Vergleich zur Se-Mangel-Gruppe signifikant vermindert, während sich die HMG-CoA S2 Proteinmenge durch ho-Selenit-Supplementierung im Vergleich zur ad-Selenit-Supplementierung sowie zum Se-Mangel signifikant verringerte (Tabelle 4-1).

4.1.1 Validierung ausgewählter Proteinidentitäten

4.1.1.1 Murines Kolongewebe

Die mRNA- und Proteinmengen ausgewählter Proteine wurden nachfolgend mittels qPCR und Western Blot validiert. Die mRNA-Expressionsspiegel von Prdx5 und Cfl1 waren durch die Se-Supplementierung nicht verändert (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2: Validierung ausgewählter differentiell exprimierter Proteine in murinem Kolongewebe via qPCR.

Gen	-Se	Selenit		Selenat		SeMet	
		ad	ho	ad	ho	ad	ho
Prdx5	1.00 ± 0.12	0.93 ± 0.05	1.05 ± 0.06	0.96 ± 0.07	0.91 ± 0.09	0.89 ± 0.08	1.00 ± 0.05
Anxa2	1.00 ± 0.13	0.69 ± 0.09*	0.81 ± 0.10	0.77 ± 0.05	0.75 ± 0.09	0.70 ± 0.05*	0.80 ± 0.07
Pgd	1.00 ± 0.18	0.74 ± 0.07*	0.82 ± 0.10	0.81 ± 0.08	0.91 ± 0.10	0.97 ± 0.07	0.92 ± 0.11
Cfl1	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.11	1.06 ± 0.11	1.09 ± 0.08	1.05 ± 0.08	1.06 ± 0.08	1.09 ± 0.08
Abhd14b	1.00 ± 0.12	1.43 ± 0.11	1.33 ± 0.26	1.33 ± 0.13	1.65 ± 0.25*	1.46 ± 0.10	1.53 ± 0.08*
Lmna	1.00 ± 0.09	1.34 ± 0.06*	1.22 ± 0.05*	1.24 ± 0.05*	1.26 ± 0.07*	1.17 ± 0.05*	1.23 ± 0.04*
Clca1	1.00 ± 0.24	2.29 ± 0.32*	2.14 ± 0.34*	1.99 ± 0.20*	2.77 ± 0.25*	2.59 ± 0.34*	2.72 ± 0.43*

Dargestellt sind MW ± SEM relativ zur Se-Mangel-Gruppe (n=8). Werte markiert mit einem * stellen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Se-Mangel-Gruppe dar ($p < 0,05$; ANOVA). –Se, Se-Mangel; ad, adäquat (150 µg Se/kg Diät); ho, hoch (750 µg Se/kg Diät).

Dagegen erhöhte sich die Proteinmenge von COF1 durch ho-Selenit und ad-Selenat-Supplementierung im Vergleich zur ad-SeMet-Gruppe signifikant. Des Weiteren erhöhte eine ho-SeMet-Supplementierung die COF1 Proteinmenge im Vergleich zur ad-SeMet-Supplementierung tendenziell (Abbildung 4-4 A) ($p=0,069$). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des 2D-DIGE-Experiments waren die mRNA-Mengen von Anxa2 in der ad-SeMet-Gruppe signifikant herunterreguliert im Vergleich zur Se-Mangel-Gruppe (Tabelle 4-1). Außerdem wurde die Anxa2 mRNA-Menge durch ad-Selenit-Supplementierung

signifikant reduziert im Vergleich zum Se-Mangel (Tabelle 4-2), während die Proteinmenge im 2D-DIGE Experiment unbeeinflusst war (Tabelle 4-1).

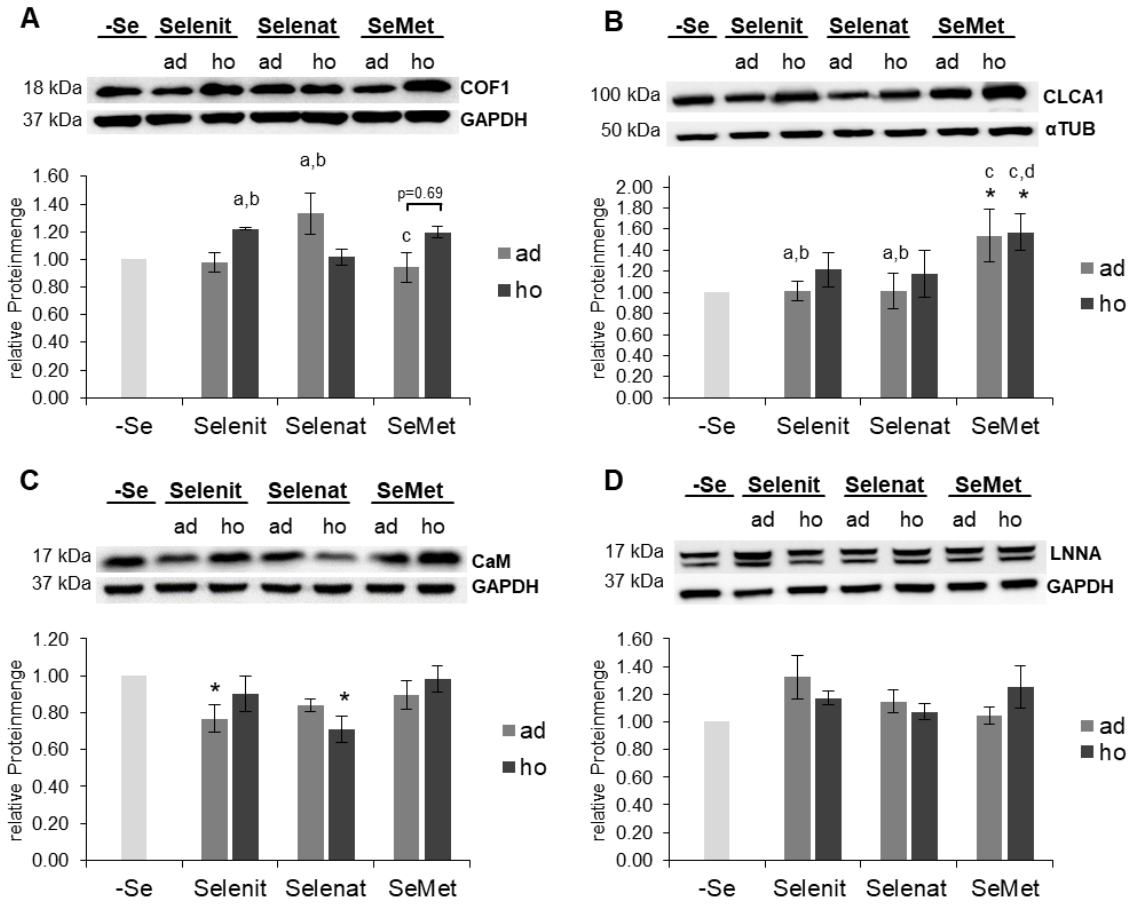

Abbildung 4-4: Validierung Se-regulierter Proteine im murinen Kolongewebe.

Die Proteinmenge von COF1 (A), CLCA1 (B), CaM (C) und LMNA (D) wurde wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben mittels Western Blot bestimmt. Beben einem repräsentativen Blot (oben) ist jeweils die Quantifizierung normalisiert auf die Proteinmenge von GAPDH bzw- αTUB (unten) und in Relation zum Se-Mangel gezeigt. Dargestellt sind MW ± SEM relativ zur Se-Mangel-Gruppe (n=4). Werte markiert mit einem * stellen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Se-Mangel-Gruppe dar ($p < 0,05$; ANOVA) und kleine Hochbuchstaben signifikante Unterschiede innerhalb der Se-supplementierten Gruppen. –Se, Se-Mangel; ad, adäquat (150 µg Se/kg Diät); hi, high (750 µg Se/kg Diät).

Bei Betrachtung der Regulation der mRNA-Mengen von *alpha/beta hydrolase domain-containing protein 14B* (Abhd14b), Prelamin-A/C (Lmna) und *calcium-activated chloride channel regulator 1* (Clca1) bestätigten sich die Ergebnisse des 2D-DIGE-Experimentes, worin eine starke Erhöhung der jeweiligen Proteinmengen der genannten Zielstrukturen in allen Se-supplementierten Gruppen im Vergleich zur Se-Mangel-Gruppe detektiert wurden (Tabelle 4-2). Des Weiteren führte insbesondere die SeMet-Supplementierung zu einer signifikanten Erhöhung der CLCA1-Proteinmenge im Vergleich zur ad-Selenit- und ad-Selenat-Supplementierung sowie zum Se-Mangel (Abbildung 4-4 B). Die erhöhte Proteinmenge von LMNA in den Se-supplementierten Gruppen im Vergleich zum Se-

Mangel konnte auf Western Blot-Ebene tendenziell bestätigt werden (Tabelle 4-2 D). Ferner wurde die Proteinmenge von CaM signifikant durch ad-Selenit- und ho-Selenat-Supplementierungen im Vergleich zur Se-Mangel-Gruppe reduziert, während die SeMet-Supplementierung keinen Einfluss zeigte (Abbildung 4-4 C).

Zusammenfassend bestätigten die durchgeführten Validierungsexperimente die Ergebnisse der 2D-DIGE bzw. konnte durch entsprechende Messungen der mRNA und/ oder Proteinmengen der Zielstrukturen ein ähnlicher Trend hinsichtlich des Effektes der Se-Supplementierungen auf deren Regulation aufgezeigt werden. Speziell die Proteine LMNA, CLCA1 sowie ABHD14B stellen interessante neue Se-regulierte Proteine dar.

4.1.1.2 Humane Kolonkarzinom-Zelllinien

Für einige der Se-abhängig regulierten Proteine, welche im murinem Kologewebe identifiziert wurden, wird eine mögliche Rolle in der Tumorentwicklung, u.a. auch im Kolonkarzinom, postuliert. Aus diesem Grund wurde unter Verwendung von humanen Kolonkarzinom-Zelllinien der Einfluss einer Behandlung mit den Se-Verbindungen Selenit, Selenat und SeMet auf ausgewählte Zielstrukturen untersucht. Hierfür wurden zum einen Kolonkarzinom-Zelllinien epithelialen Ursprungs wie die Zelllinien HCT116 und HT-29 und zum anderen die undifferenzierte Zelllinie Colo320 gewählt. Zu Beginn wurde die Viabilität sowie die metabolische Aktivität der Zelllinien nach Behandlung mit den verschiedenen Se-Verbindungen untersucht um geeignete Se-Konzentrationen für nachfolgende Experimente zu ermitteln (Abbildung 4-5).

Insbesondere Selenit führte in allen drei Kolonkarzinom-Zelllinien ab einer Konzentration von 5 µM zu einer starken Reduktion der Zellviabilität als auch der metabolische Aktivität nach einer 24-stündigen Behandlung. Die Selenat-Behandlung zeigte dagegen insbesondere in den Colo320 und HT-29 Zellen eine Steigerung beider Parameter bis zu einer Konzentration von 25 µM. Unter einer 50 µM-Selenat-Behandlung reduzierte sich die Zellviabilität und metabolische Aktivität in allen drei Zelllinien wieder im Vergleich zur 25 µM Selenat-Behandlung. SeMet zeigte auf die Zellviabilität bzw. metabolische Aktivität einen ähnlichen Effekt wie Selenat, wobei sich die Parameter erst ab einer Konzentration von 100 µM reduzierten (Abbildung 4-5 A, B).

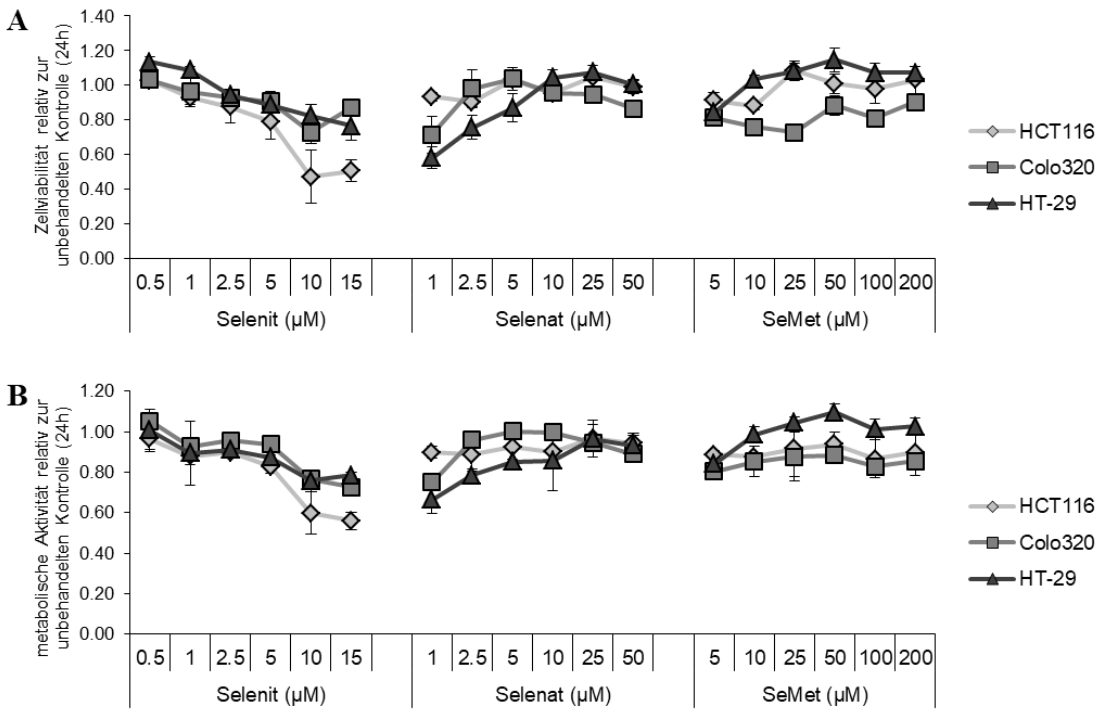

Abbildung 4-5: Einfluss von Se-Verbindungen auf die Zellviabilität und metabolische Aktivität humaner Kolonkarzinom-Zelllinien.

Zellviabilität (A) und metabolische Aktivität (B) wurden wie im Kapitel 3.6.2 beschrieben bestimmt. Dargestellt sind MW ± SEM relativ zur unbehandelten Kontrolle nach 24 h Se-Behandlung (n=3).

Da sowohl eine erhöhte als auch eine erniedrigte Expression verschiedener Selenoproteine sowohl in *in vivo* als auch in *in vitro*-Tumorexperimenten emittelt werden konnten [38,183,184], wurden die mRNA Expression der GPx1, GPx2 und TrxR1 bestimmt und innerhalb der verwendeten Zelllinien untereinander verglichen (Abbildung 4-6).

Hierbei zeigte sich, dass die Colo320 eine signifikant verringerte bzw. kaum detektierbare GPx1 mRNA-Menge im Vergleich zu HCT116 und HT-29 Zellen aufwies. Die HT-29 Zellen exprimieren zusätzlich eine signifikant und mehr als 500-fach erhöhte GPx2 mRNA Menge im Vergleich zur HCT116 und Colo320 Zelllinie. Ebenfalls signifikant erhöht im Vergleich zur HCT116 und Colo320 Zelllinie war in HT-29 Zellen die TXNRD1 mRNA-Konzentration. Die Messung der mRNA-Mengen weiterer anti-oxidativer Gene wies auf eine signifikante Erhöhung der Catalase (Cat) mRNA-Expression in Colo320 als auch HT-29 im Vergleich zur HCT116 hin.

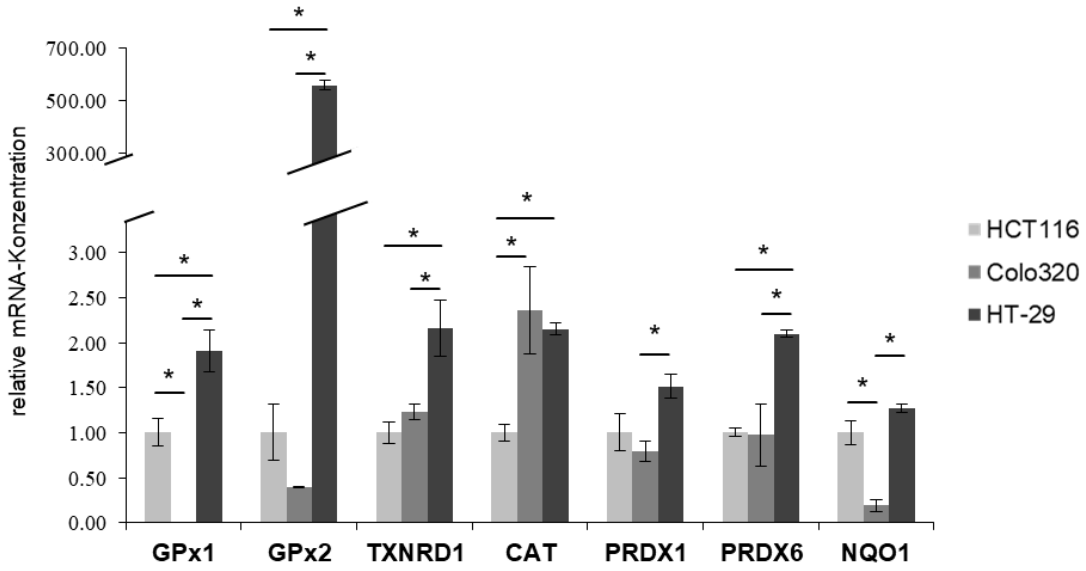

Abbildung 4-6: Unterschiedliches mRNA-Expressionsmuster anti-oxidativer Gene in humanen Kolonkarzinom-Zelllinien.

Dargestellt sind MW ± SEM relativ zu den Werten der Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 (n=3). Balken markiert mit einem * stellen signifikante Unterschiede hinsichtlich des jeweiligen Genes zwischen den Zelllinien dar ($p < 0,05$; ANOVA). GPx, Glutathionperoxidase; TXNRD1, Thioredoxinreduktase; CAT, Catalase; PRDX, Peroxiredoxin; NQO1, NAD(P)H Dehydrogenase [quinone] 1.

Des Weiteren erhöhte sich die PRDX1- und PRDX6 mRNA-Expression signifikant in HT-29-Zellen im Vergleich zu Colo320 Zellen (PRDX1/ PRDX6) bzw. HCT116-Zellen (PRDX6). Zusätzlich zeigte sich eine signifikant verminderte NQO1 mRNA-Menge (*NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1*), ein Zielgen des Transkriptions-faktors Nrf2, der an der Regulation von anti-oxidativen und Phase II- Genen beteiligt ist [185] in Colo320 Zellen im Vergleich zu HCT116- und HT-29 Zellen (Abbildung 4-6).

Folgend wurde das Expressionsmuster interessanter Zielstrukturen, die im 2D-DIGE Experiment nach Se-Supplementierung in murinem Kolongewebe beeinflusst waren (siehe Kapitel 4.1 und 4.1.1.1), in den Zelllinien bestimmt (Abbildung 4-7).

In der HT-29-Zelllinie zeigte sich eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von ABHD14B, LMNA, ANXA2 und CFL1 im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien HCT116 und Colo320. Zusätzlich war die PGD und PRDX5 mRNA-Expression in den HT-29-Zellen im Vergleich zu den Colo320-Zellen signifikant erhöht. Interessanterweise wurde für die Colo320-Zelllinie eine extrem verringerte bzw. kaum detektierbare mRNA Expression von LMNA als auch ANXA2 ermittelt (Abbildung 4-7 A).

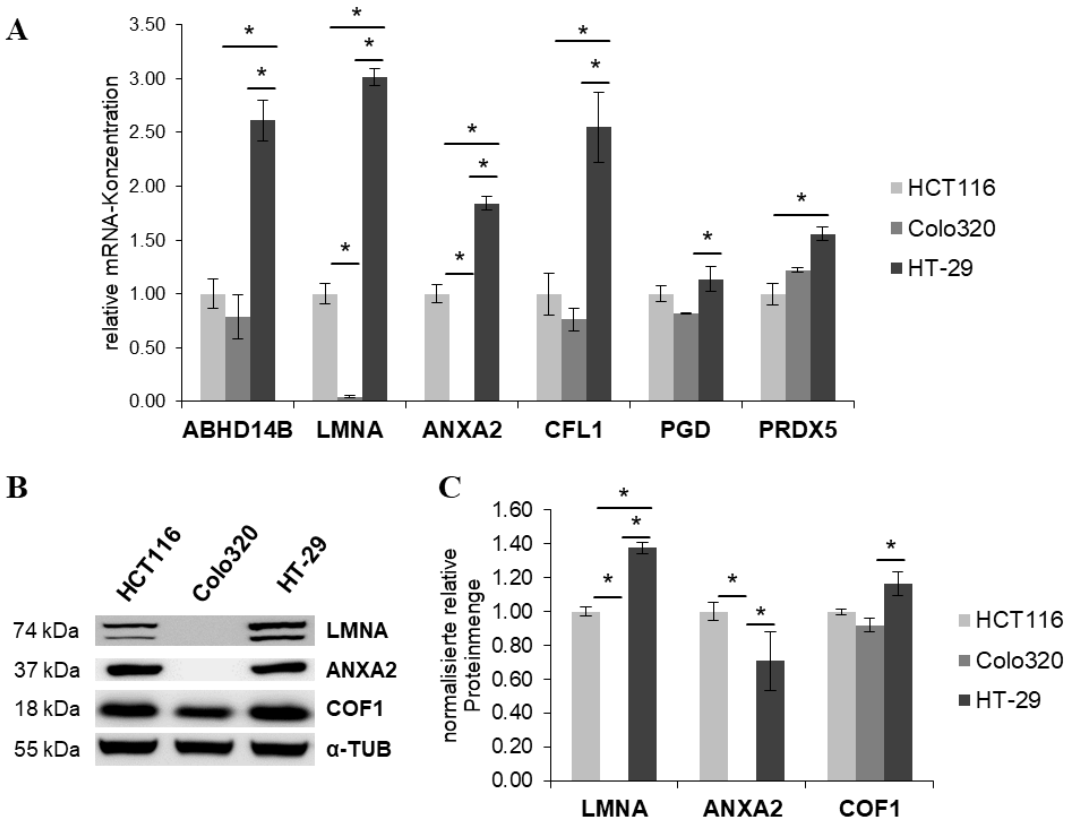

Abbildung 4-7: mRNA- und Proteinmenge ausgewählter Zielstrukturen in humanen Kolonkarzinom-Zelllinien.

Die Bestimmung der mRNA-Expression (qPCR) (A) und Proteinmenge (Western Blot) (B, C) wurde wie in den Kapiteln 3.3.3 und 3.5.1 beschrieben durchgeführt. Dargestellt sind MW ± SEM relativ zu den Werten der Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 (n=3). (B) zeigt einen repräsentativen Blot und (C) die Auswertung, normalisiert auf die Proteinmenge von α-Tubulin (α-TUB) (n=3). Werte markiert mit einem * stellen signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien dar ($p < 0,05$; ANOVA). ABHD14B; *Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 14B*; LMNA, Prelamin A/C; ANXA2, Annexin A2; CFL1/COF1, Cofilin-1; PGD, 6-Phosphogluconatdehydrogenase (decarboxylierend); PRDX5, Peroxiredoxin 5.

Dies bestätigte sich bei Betrachtung der entsprechenden Proteinmenge von LMNA und ANXA2 in den Colo320-Zellen im Vergleich zu HCT116- und HT-29-Zellen (Abbildung 4-7 B, C). Zusätzlich konnten die mRNA-Expressionsanalysen durch eine signifikant erhöhte Proteinmenge von LMNA und COF1 in HT-29-Zellen im Vergleich zu HCT116-Zellen bestätigt werden. Im Gegensatz zu den qPCR-Ergebnissen war jedoch die Proteinmenge von ANXA2 in den HT29-Zellen im Vergleich zu HCT116-Zellen erniedrigt (Abbildung 4-7 B, C).

Der Einfluss der Se-Behandlung auf mRNA-Expression und Proteinmenge ausgewählter Zielstrukturen in den Kolonkarzinom-Zelllinien wurde anschließend analysiert. Hierbei führte eine Behandlung mit 0,5 µM Selenit und 25 µM Selenat zu einer signifikant verringerten ANXA2 mRNA-Expression in den HCT116-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (UB) nach 24 h (Tabelle 4-3).

Tabelle 4-3: mRNA-Expression ausgewählter Gene in Kolonkarzinom-Zelllinien nach Se-Behandlung (24 h).

Gen		ANXA2		PRDX5	PGD
Zelllinie		HCT116	HT-29	Colo320	HCT116
UB		1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.07
Selenit	0.5 µM	0.75 ± 0.07*	1.61 ± 0.22 *[a]	1.11 ± 0.05	0.88 ± 0.08
	2.5 µM	0.85 ± 0.04	1.28 ± 0.11	1.12 ± 0.01	0.81 ± 0.06
Selenat	5 µM	0.82 ± 0.10	1.46 ± 0.27	1.19 ± 0.10	0.78 ± 0.04
	25 µM	0.75 ± 0.06*	1.08 ± 0.06[b]	1.25 ± 0.26	0.76 ± 0.11*
SeMet	10 µM	0.81 ± 0.12	1.26 ± 0.13	1.41 ± 0.28*	0.82 ± 0.10
	50 µM	0.82 ± 0.09	1.50 ± 0.14*	1.13 ± 0.02	0.86 ± 0.06

Gen		CFL1			LMNA	
Zelllinie		HCT116	Colo320	HT-29	HCT116	HT-29
UB		1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.11
Selenit	0.5 µM	0.93 ± 0.05	1.01 ± 0.04	1.21 ± 0.09	0.83 ± 0.15	1.08 ± 0.05
	2.5 µM	0.91 ± 0.11	1.15 ± 0.17	1.22 ± 0.11	0.82 ± 0.09	0.98 ± 0.12
Selenat	5 µM	0.84 ± 0.02	1.04 ± 0.26	1.09 ± 0.13	0.81 ± 0.08	1.00 ± 0.14
	25 µM	0.89 ± 0.13	1.25 ± 0.32	1.06 ± 0.05	0.87 ± 0.15	1.03 ± 0.02
SeMet	10 µM	0.82 ± 0.11	1.26 ± 0.24	1.12 ± 0.15	1.07 ± 0.21	1.08 ± 0.12
	50 µM	0.85 ± 0.15	1.16 ± 0.07	1.16 ± 0.09	0.91 ± 0.08	1.08 ± 0.01

Dargestellt sind MW ± SEM relativ zur unbehandelten Kontrolle (UB) (n=3). Werte markiert mit einem * stellen signifikante Unterschiede im Vergleich zur UB dar und kleine Hochbuchstaben weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Se-Behandlungen hin ($p < 0,05$; ANOVA). ANXA2, Annexin A2; PRDX5, Peroxiredoxin 5; PGD; 6-Phosphogluconatdehydrogenase (decarboxylierend); CFL1, Cofilin-1.

Eine vergleichende Betrachtung der Ergebnisse des murinen Fütterungsversuches über zeigte auf, dass eine ho-Selenat-Supplementierung signifikant die ANXA2 Proteinmenge im murinen Kolongewebe und auch tendenziell die Anxa2 mRNA-Expression im Vergleich zur Se-Mangel-Gruppe reduzierte (p=0,053) (siehe Tabelle 4-1; Tabelle 4-2). Zusätzlich reduzierte eine ad-Selenit-Supplementierung in murinem Kolongewebe die mRNA-Expression von Anxa2 signifikant im Vergleich zum Se-Mangel, was sich jedoch nicht auf Proteinebene widerspiegelte (siehe Tabelle 4-1; Tabelle 4-2). Der Einfluss von SeMet auf die ANXA2 mRNA und Proteinmenge, die sich durch ad- (Protein/ mRNA) und ho-SeMet (Protein)-Supplementierung im murinen Kolongewebe signifikant verringerte, konnte in den HCT116-Zellen nicht signifikant bestätigt werden, jedoch führte eine 0,5 µM Selenit-Behendlung zu einer signifikant reduzierten ANXA2 mRNA-Menge im Vergleich zur UB in dieser Zelllinie. In den Colon320 Zellen veränderte sich die ANXA2 mRNA Expression nicht durch die Behandlung mit den Se-Verbindungen (Daten nicht gezeigt). Die HT-29-Zellen zeigten eine entgegengesetzte Reaktion auf der Se-Behandlung hinsichtlich der ANXA2 mRNA-Konzentration. Eine 0,5 µM Selenit- und 50 µM SeMet-Behandlung erhöhte in den

HT-29-Zellen signifikant die ANXA2 mRNA-Expression nach 24 h im Vergleich zur UB. Zusätzlich wurde die ANXA2 mRNA-Konzentration signifikant durch eine 0,5 µM Selenit-Behandlung im Vergleich zur 25 µM Selenat-Behandlung hochreguliert.

Eine weitere Zielstruktur des 2D-DIGE-Experimentes des murinen Kolongewebes war das anti-oxidativ wirkende Protein PRDX5, wobei sich dessen Proteinmenge signifikant durch ad-Selenat- und ad-SeMet-Supplementierung im Vergleich zum Se-Mangel im murinen Kolongewebe reduzierte, während die Prdx5 mRNA-Menge unbeeinflusst blieb (siehe Tabelle 4-1, Tabelle 4-2). Vergleichend dazu steigerte eine 10 µM SeMet Behandlung in den Colo320-Zellen die PRDX5 mRNA-Expression signifikant im Vergleich zur UB führte (Tabelle 4-3), während in den anderen beiden Zelllinien kein signifikanter Effekt auf die mRNA Expression dieses Gens bestimmt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Die mRNA-Menge der 6-Phosphogluconatdehydrogenase (decarboxylierend) (PGD), ein Enzym des Pentose-Phosphat-Weges, reduzierte sich im murinen Kolongewebe nach 20-wöchiger ad-Selenit-Supplementierung signifikant im Vergleich zum Se-Mangel während eine ad-SeMet-Supplementierung die PGD Proteinmenge zum einen im Vergleich zur ad-Selenit-Gruppe signifikant erhöhte und zum anderen im Vergleich zur ho-SeMet-Supplementierung signifikant verringerte (siehe Tabelle 4-1, Tabelle 4-2). Die PGD mRNA Menge wurde hingegen nur in den HCT116-Zellen durch eine 24-stündige Behandlung mit 25 µM Selenat signifikant im Vergleich zur UB reduziert (Tabelle 4-3).

Abschließend wurde der Effekt von Se auf die mRNA- und Proteinmenge von Cofilin (Cfl1/COF1) und Prelamin A/C (LMNA) näher betrachtet (Abbildung 4-8; Abbildung 4-9).

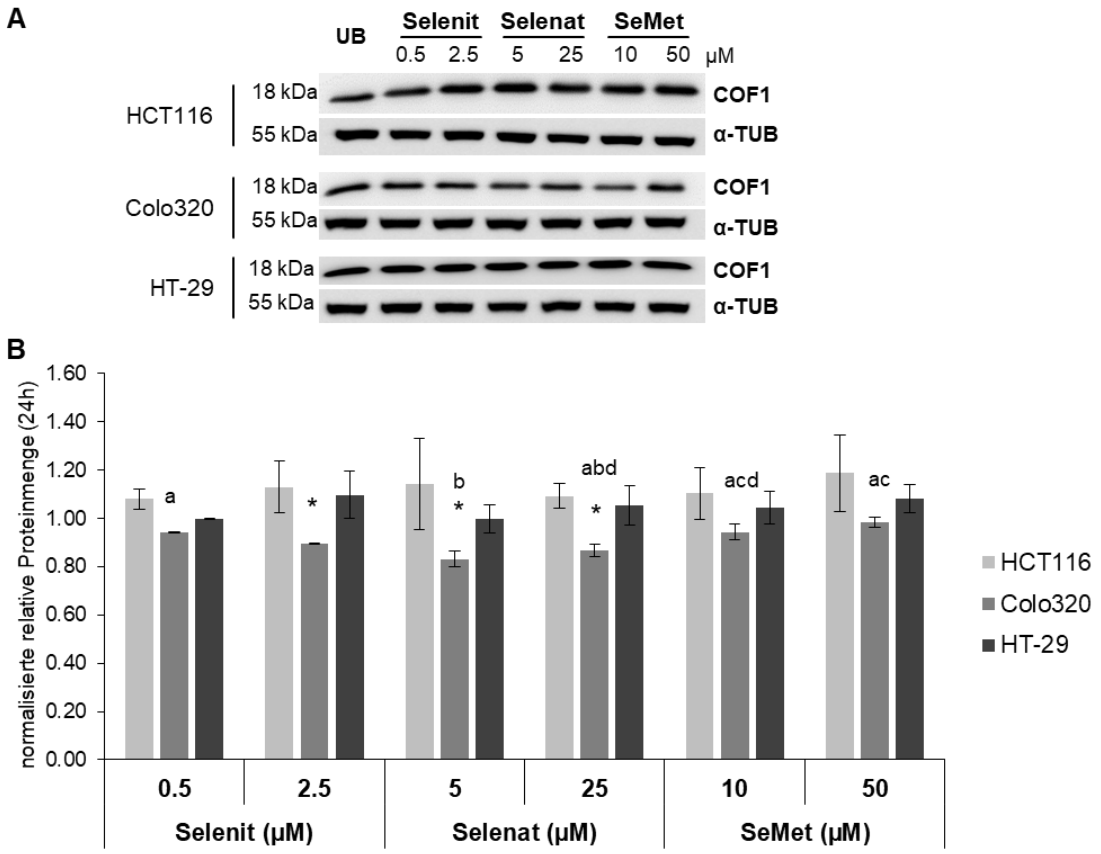

Abbildung 4-8: Eine Se-Behandlung beeinflusst die Proteinmenge von COF1 in der Kolonkarzinom-Zelllinie Colo320.

Die Bestimmung der Proteinmenge von Cofilin-1 (COF1) mittels Western Blot wurde wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, durchgeführt. Dargestellt sind MW ± SEM relativ zu den Werten der unbehandelten Kontrolle (UB) nach 24 h (n=3). (A) zeigt für jede Zelllinie einen repräsentativen Blot und (B) die Auswertung normalisiert auf die Proteinmenge von α-Tubulin. Werte markiert mit einem * stellen signifikante Unterschiede im Vergleich zur UB dar. Kleine Hochbuchstaben weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Se-Behandlungen hin ($p < 0,05$; ANOVA).

Die mRNA-Konzentration von Cfl1 wurde im 20-wöchigen Fütterungsversuch im murinen Kolongewebe als auch in den humanen Kolonkarzinom-Zelllinien durch eine Se-Behandlung nicht signifikant beeinflusst (Tabelle 4-2; Tabelle 4-3). Im murinen Kolongewebe wurde die COF1 Proteinmenge durch Se-Supplementierung, insbesondere in den Selenat und SeMet supplementierten Gruppen im Vergleich zur Se-Mangel-Gruppe erhöht. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den Colo320-Zellen eine signifikant verringerte COF1-Proteinmenge durch die Behandlung mit 2,5 µM Selenit sowie mit 5 bzw. 25 µM Selenat im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 4-8 A, B).

Die Proteinmenge von LMNA wurde auf den 2D-DIGE-Gelen des murinen Kolongewebes insbesondere durch ho-Selenit sowie durch beide SeMet-Supplementationen signifikant im Vergleich zum Se-Mangel erhöht (Tabelle 4-1), welches sich auf mRNA Ebene bestätigte (Tabelle 4-2).

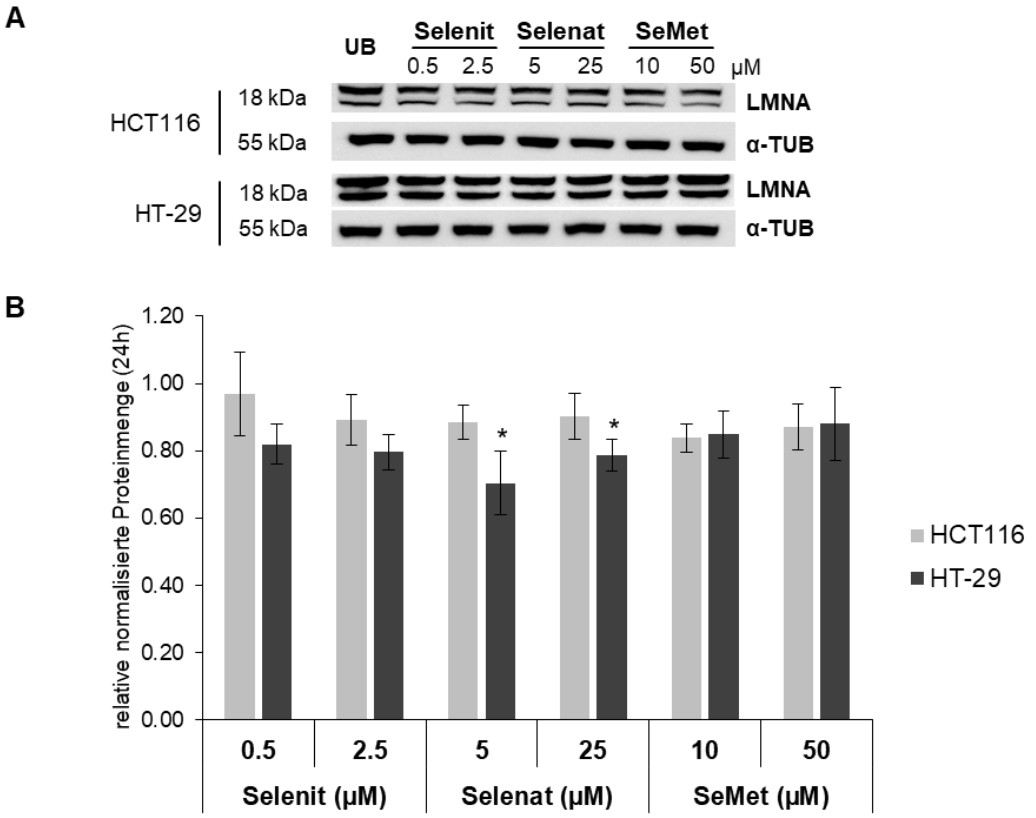

Abbildung 4-9: Veränderte LMNA-Proteinmenge durch Selenat-Behandlung in HT-29-Zellen.

Die Bestimmung der Proteinmenge von Prelamin A/C (LMNA) mittels Western Blot wurde wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, durchgeführt. Dargestellt sind MW ± SEM relativ zu den Werten der unbehandelten Kontrolle (UB) nach 24 h (n=3). (A) zeigt für jede Zelllinie einen repräsentativen Blot und (B) die Auswertung normalisiert auf die Proteinmenge von α-Tubulin. Werte markiert mit einem * stellen signifikante Unterschiede im Vergleich zur UB dar ($p < 0,05$; ANOVA).

Nachfolgend konnte mittels Western Blot eine tendenzielle aber nicht signifikante Erhöhung der LMNA-Proteinmenge detektiert werden (Abbildung 4-4 D). In den Experimenten mit Kolonkarzinom-Zelllinien konnte unter Se-Behandlung kein Einfluss auf die LMNA mRNA-Menge sowohl in HCT116- als auch HT-29-Zellen detektiert werden (Tabelle 4-3). In nachfolgenden Western Blot-Analysen zeigte sich eine signifikant verringerte LMNA-Proteinmenge durch 5 µM sowie 25 µM Selenat-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (UB) (Abbildung 4-9).

Als Fazit der Validierungsexperimente mit Kolonkarzinom-Zelllinien konnte eine heterogene Expression der zuvor im murinen Kolongewebe gefundenen Se-regulierten Zielproteine festgestellt werden. Hierbei zeigte insbesondere die HT-29 Zelllinie signifikant erhöhte Mengen an Abhd14b (mRNA), LMNA (mRNA/ Protein), ANXA2 (mRNA) sowie COF1 (mRNA/ Protein) im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien HCT116 und Colo320, welches zusätzlich mit einer signifikanten Erhöhung (ca. 500-fach) der GPx2 mRNA-Menge einherging (Abbildung 4-6, Abbildung 4-7). Des Weiteren wurde durch eine Selenat-

Behandlung (5 µM, 25 µM) in HT-29-Zellen die LMNA-Proteinmenge im Vergleich zur UB signifikant reduziert und in den Colo320 Zellen führte eine 2,5 µM Selenit- als auch 5 µM und 25 µM Selenat-Behandlung zu einer signifikant verringerten COF1 Proteinmenge im Vergleich zur UB (Abbildung 4-8, Abbildung 4-9). Somit konnte zumeist keine entsprechende Regulation der untersuchten Zielstrukturen durch Se in den humanen Kolonkarzinom-Zellen wie im murinen Kolongewebe ermittelt werden.

4.2 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Se-Verbindungen auf den Redoxstatus von Proteinen

4.2.1 Implementierung eines neuen Redox-DIGE Ansatzes

Da es zum einen unter den Se-Mangel-Konditionen und zum anderen auch durch die verwendeten Se-Verbindungen bzw. eingesetzten Se-Konzentrationen in den Diäten zur Ausbildung von oxPTMs an Proteinen kommen könnte wurde das Redoxproteom des murinen Kolongewebes untersucht. Dadurch kann eine Aussage über den Redoxstatus der Proteine nach den Se-Supplementationen getroffen werden. Als experimenteller Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit eine neue Variante der Redox-DIGE entwickelt. Im Gegensatz zu anderen Redox-DIGE-Strategien werden hierbei sowohl die freien/reduzierten als auch die oxidierten Cys-Reste adressiert, wodurch über die Bildung des Verhältnisses beider Zustände eines Proteins dessen Redoxstatus in Abhängigkeit zu den jeweiligen Se-Supplementierungen bestimmt werden konnte.

4.2.2 Verschiedene Se-Verbindungen ändern den Redoxstatus diverser Proteine in murinem Kolongewebe

Die beiden Subproteome, welche erstens die freien/ reduzierten Cys-Reste und zweitens die oxidierten Cys-Reste adressierten, wurden wie in Kapitel 3.4.3.1.2 beschrieben generiert. Nach Auswertung der 74 Redox-DIGE-Gele (pro Se-Verbindung 24 Redox-DIGE-Gele) wurden insgesamt 879 Proteinspots auf dem Redoxproteom des murinen Kolongewebes detektiert. Davon zeigten 70 Proteinspots signifikante Veränderungen in ihrem Redoxstatus auf. Mittels MALDI-TOF-MS konnten abschließend 17 Proteinstrukturen signifikant identifiziert werden (Tabelle 4-4, Abbildung 4-10).

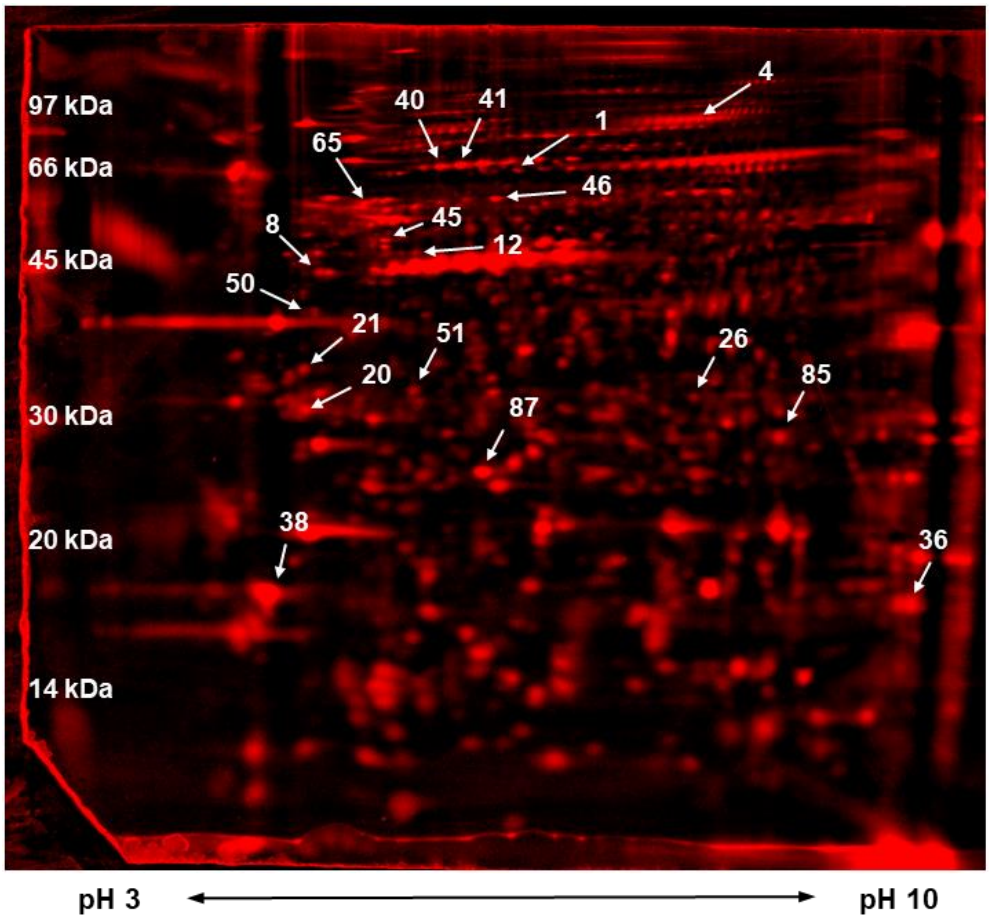

Abbildung 4-10: Identifizierte Redox-modifizierte Proteine nach Se-Supplementierung in murinen Kolongewebe.

Repräsentatives Gelbild mit Kennzeichnung der signifikant identifizierten Proteinspots mit veränderten Redoxstatus (Probe –Se), welche wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben selektiert und identifiziert wurden (siehe auch Tabelle 4-4).

Tabelle 4-4: Se-Supplementierungen verändern den Redoxstatus von Proteinen in murinem Kolongewebe.

Nr.	Proteinname	Gen	Uniprot ID	Masse (Da)	pI	Score	passende Peptide	Sequenzabdeckung (%)	Selenit		Selenat		SeMet	
									ad	ho	ad	ho	ad	ho
	Antioxidative Aktivität (GO:0016209)													
85	**Peroxiredoxin-6 (PRDX6)**	Prdx6	O08709	24969	5.71	91	8	46	1.03	1.07^{a}	0.87	0.84	0.87	0.62*^{b}
	Ligandbindung/ -interaktion (GO:0005488)													
1/40/41	**Heat shock cognate 71 kDa protein (HSPA8)**	Hspa8	P63017	71055	5.37	72	15	26	1.21	1.57	0.98^{a}	1.25	1.42^{b}	1.27
						131	19	30	1.19	1.57*	1.40	1.44	1.25	1.15
						147	23	32	1.11	1.26^{a}	1.15	1.14	1.05	0.97^{b}
51	**Ankyrin repeat domain-containing protein 13B (AN13B)**	Ankrd13b	Q5F259	76058	6.76	62	10	16	2.35^{a}	2.51^{a,b}	0.17^{b}	0.71^{a,b,c}	0.60^{b}	0.52^{a,b,d}
87	**Phosphatidyl-ethanolamine-binding protein 1 (PEBP1)**	Pebp1	P70296	20988	5.19	75	5	39	1.11^{a}	1.01^{a,b}	1.10^{a}	1.20^{a,b,c}	1.28^{b}	1.12
21	**Annexin A5 (ANXA5)**	Anxa5	P48036	35787	4.83	185	19	49	1.16	0.79*	0.91	1.02	0.97	1.02
	Zytoskelettbestandteil (GO:0005200)													
4	**Prelamin-A/C (LMNA)**	Lmna	P48678	74478	6.54	61	8	16	1.53^{a}	1.47^{a,b}	1.19^{a}	1.47^{a,b}	0.27^{b}	0.38^{a,b,c}
8						61	8	18	1.16^{a}	1.03	1.05	1.19	0.91^{b}	1.01
45	**Desmin (DES)**	Des	P31001	53522	5.21	210	28	60	1.03^{a}	1.03^{a,b}	1.14	1.00^{a,b}	1.25^{b}	1.34^{a,b,c}
46						70	12	27	5.62^{a}	4.53*^{a,b}	1.04^{b}	1.30^{a,b,c}	1.94^{b}	2.26^{a,b,d}
50						123	14	27	1.09	1.01^{a}	1.21	1.31^{b}	1.32	1.08
12	**Actin, cytoplasmatic 1 (ACTB)**	ActB	P60710	42052	5.29	67	7	23	1.27	1.33^{a}	1.36	1.08	1.30	0.79*^{b}
38	**Myosin regulatory light polypeptide 9 (MYL9)**	Myl9	Q9CQ19	19898	4.8	148	16	71	1.18	1.39	1.08	1.08	1.16	1.18
20	**Tropomyosin alpha-3 chain (TPM3)**	Tpm3	P21107	33031	4.68	59	8	19	1.13^{a}	0.98	0.91	1.10	0.69^{b}	1.01*
65	**Tubulin beta-4b chain (TBB4B)**	Tubb4b	P68372	50255	4.79	75	13	26	1.16	1.37^{a}	1.22	1.08^{a}	0.99	0.67*^{b}
	Katalytische Aktivität (GO:0003824)													
26	**Carbonic anhydrase 2 (CA-II)**	Ca2	P00920	29129	6.49	92	11	51	1.34^{a}	0.92*	0.92^{b}	0.98	1.06	0.97
36	**Anterior gradient protein 2 homolog (AGR2)**	Agr2	O88312	19965	9.04	88	9	42	0.92	0.93	1.05	0.89	0.88	0.80

Dargestellt sind MW (n=4) im Verhältnis zur Se-Mangel-Gruppe (-Se). Rot/grün markierte Boxen zeigen einen signifikant erhöhten/niedrigeren reduzierten Protein-Redoxstatus im Verhältnis zur Se-Mangel-Gruppe auf. Werte gekennzeichnet mit * stellen signifikante Unterschiede der ho-Se-Gruppe im Vergleich zur korrespondierenden ad-Se-Gruppe dar und Werte markiert mit kleinen Hochbuchstaben weisen auf einen signifikant veränderten Redoxstatus des jeweiligen Proteins zwischen Gruppen supplementiert mit den gleichen Se-Konzentrationen hin ($p < 0,05$; ANOVA). ad, adäquat (150 µg Se/kg Diät); ho, hoch (750 µg Se/kg Diät).

Von diesen Proteinen konnten sowohl das *heat shock cognate 71 kDa protein* (HSPA8) als auch Desmin (DES) in mehreren Proteinspots identifiziert werden. Insgesamt sechs der identifizierten Proteine haben eine Funktion als Zytoskelettbestandteil. Dazu zählen LMNA, DES, beta-Aktin (ACTB), *tropomyosin alpha-3 chain* (TPM3), *myosin regulatory light polypeptide 9* (MYL9) und *tubulin beta-4b chain* (TBB4B). Somit gehörten bezüglich ihrer molekularen Funktion 46 % der identifizierten Proteine zur GO-Gruppe der strukturellen Zytoskelettbestandteile, gefolgt von Proteinen mit der Funktion der Ligandbindung bzw. Ligandinteraktion (31 %) (Abbildung 4-11 A).

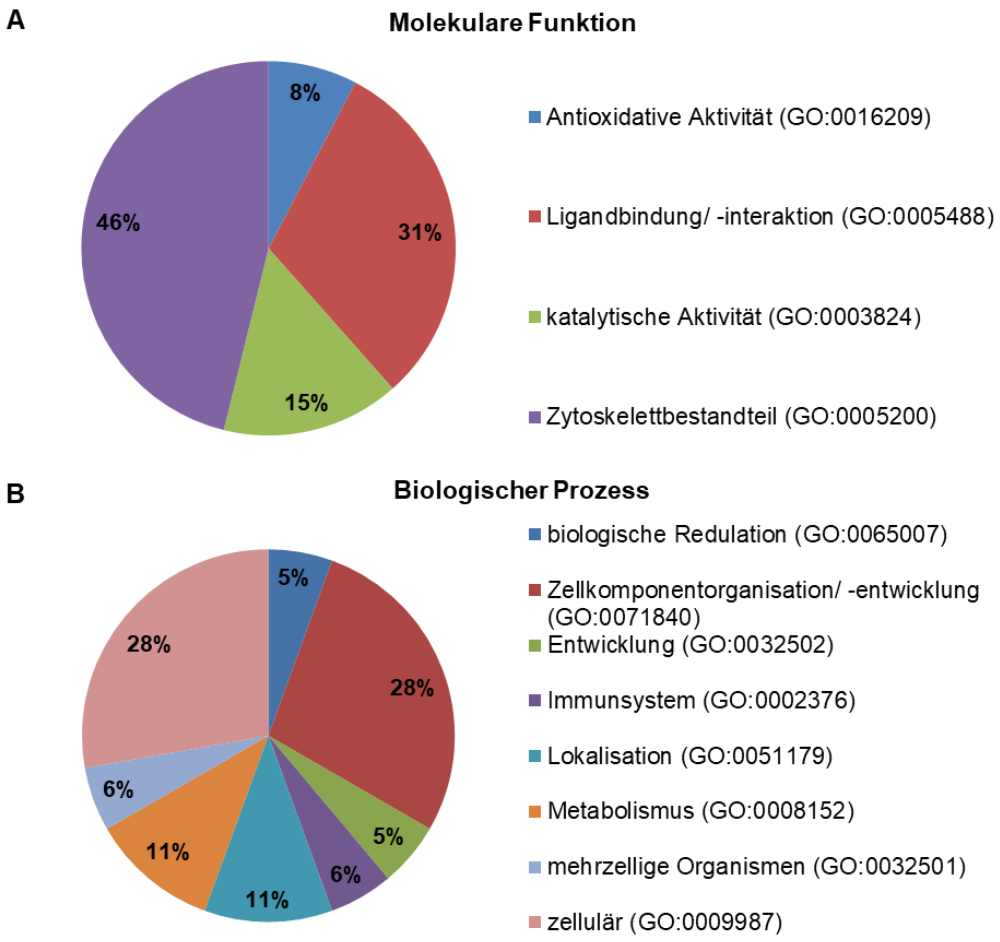

Abbildung 4-11: Klassifizierung der Proteine mit verändertem Redoxstatus in murinem Kolongewebe.

Die Klassifizierung der signifikant identifizierten Proteinspots nach ihrer molekularen Funktion (A) und der Beteiligung an biologischen Prozessen (B) wurde mit Hilfe des PANTHER.org Softwarewerkzeuges erstellt.

Bezüglich der Klassifizierung der Proteine nach ihrer Beteiligung an biologischen Prozessen wurde deutlich, dass die meisten Proteine entweder in die GO-Gruppe Zellkomponentenorganisation/-entwicklung (28 %) oder als beteiligt an zellulären physiologischen Prozessen (28 %) zugeordnet werden konnten (Abbildung 4-11 B). Bei

Betrachtung des Interaktionsnetzwerkes (Abbildung 4-12 A) zeigte sich insbesondere, dass Proteine die an der Aufrechterhaltung des Zytoskelettes beteiligt sind, auch miteinander in Beziehung stehen. Diese Proteine wurden in Abbildung 4-12 B nochmals rot hervorgehoben. Zusätzlich interagiert das Chaperon HSPA8 ebenfalls mit dem Zytoskelett, hierbei im Speziellen mit ACTB bzw. TBB4B und mit dem redox-aktiven Enzym Peroxiredoxin-6 (PRDX6).

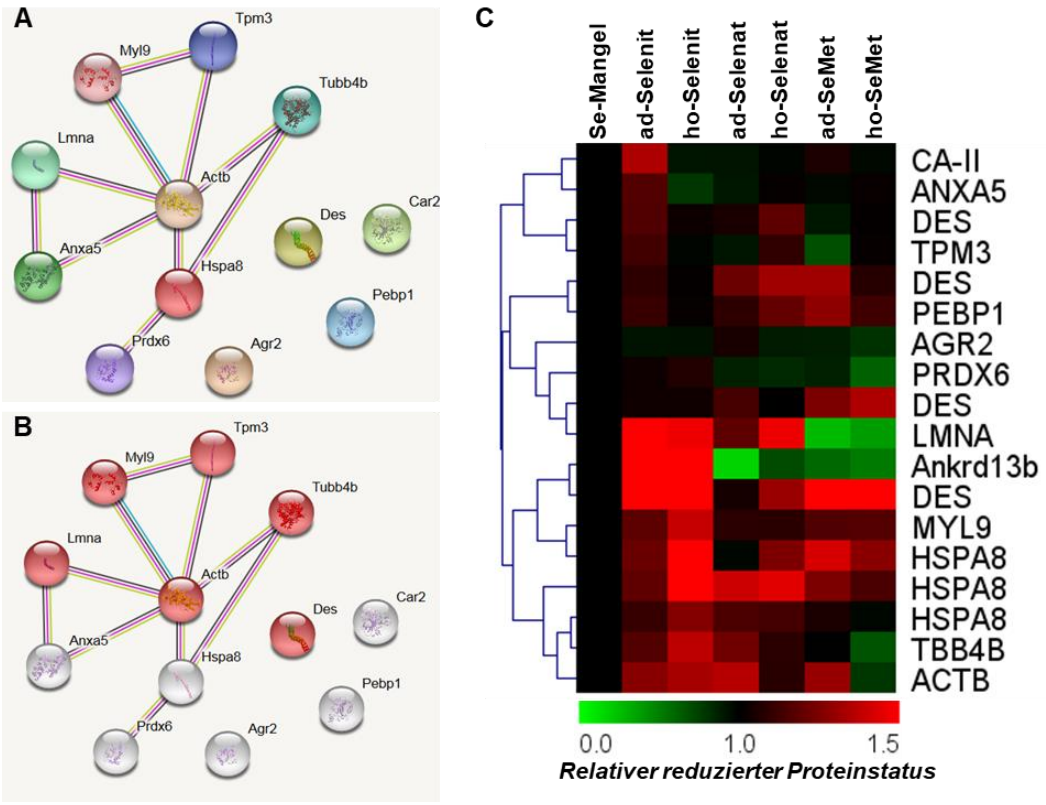

Abbildung 4-12: Interaktionsnetzwerk und Heatmap redox-modifizierter Proteine.

Das Interaktionsnetzwerk (A) der Proteine verändert in ihrem Redoxstatus nach Se-Supplementierung und (B) mit Hervorhebung der Proteine die zum Zytoskelett zählen wurde mit STRING generiert. Die Heatmap (C) wurde unter Verwendung des *MultiExperiment Viewer* (*MeV, The Institute for Genomic Research* (TIGR)) erstellt.

Nach der Se-Supplementierung zeigte sich in den meisten Fällen, dass die Se-Mangel-Gruppe im Vergleich zu den Se-supplementierten Gruppen einen geringeren reduzierten Proteinstatus aufwies (Tabelle 4-4, Abbildung 4-12 C). Dies deutet im Umkehrschluss auf einen erhöhten oxidierten Status des jeweiligen Proteins in der Se-Mangel-Gruppe hin. Zusätzlich zeigte sich auch ein unterschiedlicher Einfluss der Se-Verbindungen auf den Redoxstatus von beispielsweise LMNA oder PRDX6. In Bezug auf LMNA führte die SeMet-Supplementierung in beiden Konzentrationen zu einem verminderten reduzierten Proteinstatus im Vergleich zum Se-Mangel und im Gegensatz dazu erhöhten die ad-/ho-Selenit- bzw. ho-Selenat-Supplementierungen signifikant den reduzierten Redoxstatus von LMNA im Vergleich zur Se-Mangel-Gruppe. Hinsichtlich PRDX6 zeigte sich ein signifikant

verminderter reduzierter Proteinstatus durch ho-SeMet-Supplementierung im Vergleich zum Se-Mangel sowie zur ad-SeMet-Supplementierung (Tabelle 4-4). Selenit und Selenat hatten in den jeweiligen Konzentrationen keinen signifikanten Effekt im Vergleich zum Se-Mangel auf den reduzierten Redoxstatus von PRDX6. In Bezug auf HSPA8 und DES, welche beide in mehreren Spots identifiziert wurden, zeigte sich ein annähernd gleicher reduzierter Proteinstatus der Proteinspots nach den Se-Supplementierungen. Der reduzierte Proteinstatus von HSPA8 war insbesondere in der ho-Selenit-Gruppe im Vergleich zur Se-Mangel-Gruppe signifikant erhöht. Der Redoxstatus der vier identifizierten DES-Spots wurde speziell durch die SeMet-Supplementierung im Vergleich zum Se-Mangel reduziert (Tabelle 4-4, Abbildung 4-12 C).

4.2.3 Validierung des Redoxstatus von PRDX6

Ein interessantes Protein, welches durch das Redox-DIGE Experiment identifiziert wurde, war PRDX6 (Tabelle 4-4). PRDX6 hat eine Masse von 24,8 kDa und dessen Sequenz besteht aus 224 Aminosäuren (AS). Dieses Protein hat zum einen eine Funktion in der zellulären Redox-Regulation und zum anderen besitzt es zusätzlich eine Phospholipase-Aktivität [186]. Zur Validierung des PRDX6- Redoxstatus wurde ein Ansatz des Redox-Blotes angewandt (Kapitel 3.5.2). Hierfür wurden die NEM-Gruppenpools 0-VI jeweils mit und ohne Reduktionsmittel (β-ME) im Laemmli-Puffer behandelt und eine 1D-SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Beide Membranen in Abbildung 4-13 wurden mit der gleichen AK-Verdünnung inkubiert, zur gleichen Zeit detektiert und die relativen reduzierten Proteinstatus-Werte bezogen auf die jeweilige Se-Mangel-Probe (Pool 0) ermittelt.

Bei Betrachtung der nicht-reduzierten Gruppenpools (nicht-red, rechte Seite Abbildung 4-13 A) wo bestehende Disulfidbrücken erhalten blieben, konnte der verminderte reduzierte PRDX6 Proteinstatus durch die ho-SeMet-Supplementierung im Vergleich zum Se-Mangel tendenziell bestätigt werden. Zusätzlich zeigte sich ein verminderter reduzierter PRDX6 Proteinstatus in der ho-SeMet-Gruppe im Vergleich zur ad-SeMet-Gruppe.

Ebenfalls konnte ein Unterschied hinsichtlich des reduzierten PRDX6-Proteinstatus durch ho-Selenit Supplementierung im Vergleich zur ho-SeMet Supplementierung auf dem Redox-Blot ermittelt werden (Abbildung 4-13 B). Bei Betrachtung des Redox-Blotes weist im Gegensatz zum Redox-DIGE-Experiment die ho-Selenit-Supplementierung auf einen erhöhten reduzierten PRDX6-Proteinstatus im Vergleich zur ad-Selenit-Supplementierung hin. Dies bedeutet, dass PRDX6 in der ad-Selenit-Gruppe in einem erhöhten oxidierten Proteinstatus im Vergleich zur ho-Selenit-Gruppe vorliegt (Abbildung 4-13 B, C).

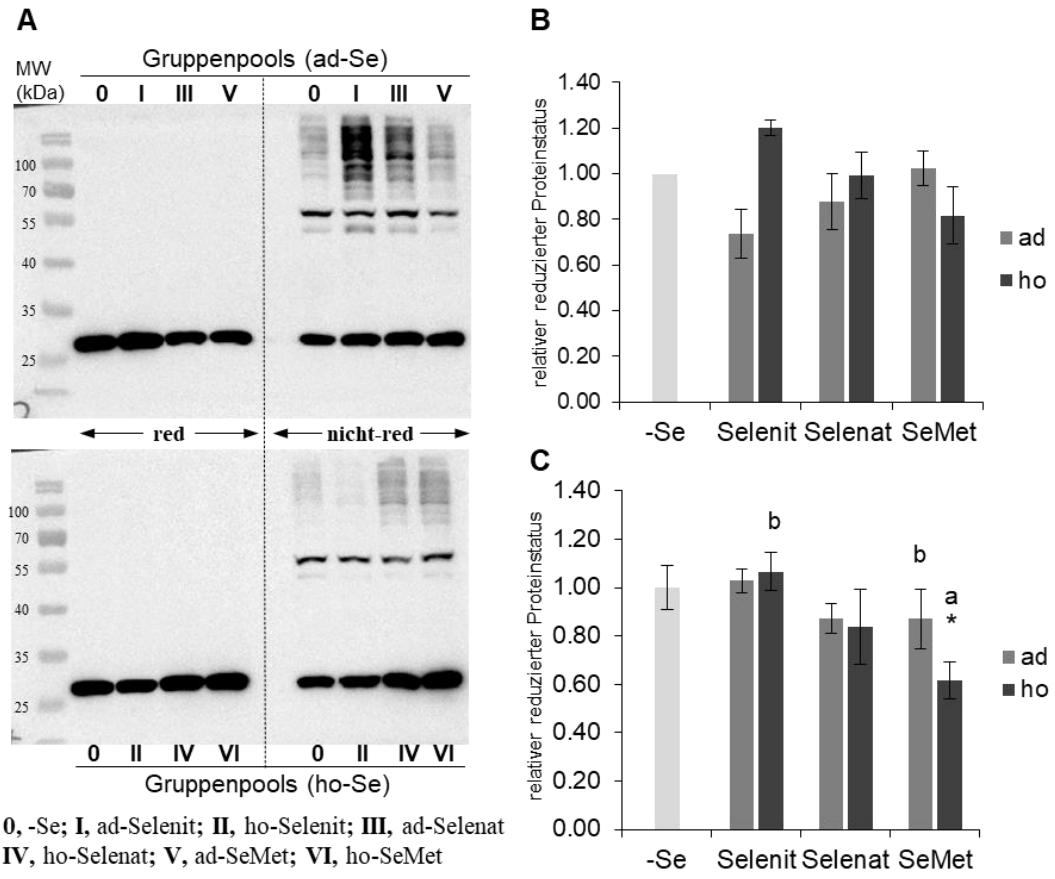

Abbildung 4-13: Validierung des PRDX6 Redoxstatus.

(A) zeigt einen repräsentativen Redox-Blot der Gruppenpools aus je vier Replikaten erstellt wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben. Dargestellt ist eine entsprechende Überlagerung des Lumineszenzbildes mit dem Markerbild. (B) Die Redox-Blots wurden entsprechend der Redox-DIGE-Daten ausgewertet (Kapitel 3.4.3.5.3) (n=2). (C) Redox-DIGE Ergebnis bzgl. des relativen reduzierten Proteinstatus von PRDX6 als Vergleich. Dargestellt sind MW ± SEM relativ zur Se-Mangel-Gruppe. Werte markiert mit einem * stellen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Se-Mangel-Gruppe dar (n=4) ($p < 0,05$; ANOVA) und kleine Hochbuchstaben signifikante Unterschiede innerhalb der Se-supplementierten Gruppen. ad, adäquat (150 µg Se/kg Diät); ho, high (750 µg Se/kg Diät); red, reduzierend; nicht-red, nicht reduzierend.

Hinsichtlich der Seite der Membranen bei denen die NEM-Kolongewebelysate mit normalen Laemmli-Buffer (+β-ME, Abbildung 4-13 A links) inkubiert wurden, schien sich ein genereller Einfluss der Se-Supplementierungen auf die Proteinmenge von PRDX6 aufzuzeigen. Aus diesem Grund wurden nachfolgend die mRNA- und Proteinmenge von PRDX6 in den murinen Kolongewebeproben bestimmt (Abbildung 4-14).

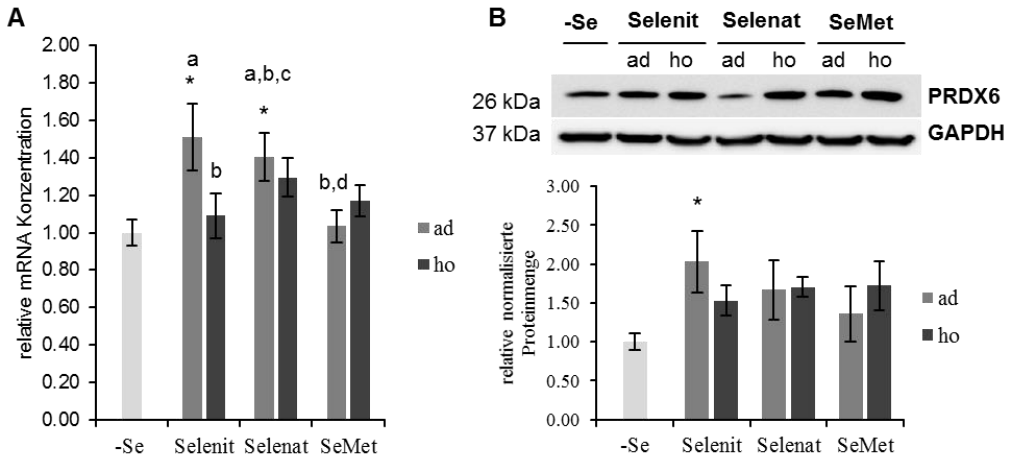

Abbildung 4-14: mRNA- und Proteinmenge von PRDX6 in murinem Kolongewebe.

(A) zeigt die mRNA-Menge von Prdx6 (n=8). In (B) ist ein repräsentativer Blot (oben) mit der entsprechenden Auswertung der PRDX6 Proteinmenge normalisiert auf die Proteinmenge der GAPDH (unten) gezeigt. mRNA- und Proteinmenge wurden wie in den Kapiteln 3.3.3 bzw. 3.5.1 ermittelt (n=4). Dargestellt sind MW ± SEM relativ zur Se-Mangel-Gruppe. Werte markiert mit einem * stellen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Se-Mangel-Gruppe dar. Kleine Hochbuchstaben markieren signifikante Unterschiede innerhalb der Se-supplementierten Gruppen ($p < 0,05$; ANOVA). –Se, Se-Mangel; ad, adäquat (150 µg Se/kg Diät); ho, hoch (750 µg Se/kg Diät).

Ad-Selenit- und ad-Selenat-Supplementierungen erhöhten die mRNA-Menge von PRDX6 signifikant im Vergleich zum Se-Mangel. Zusätzlich führte die ad-Selenit Supplementierung im Vergleich zur ho-Selenit-Supplementierung zu einer signifikant erhöhten Prdx6 mRNA-Konzentration. Außerdem reduzierte sich die Prdx6 mRNA-Menge signifikant in der ad-SeMet-Gruppe im Vergleich zur ad-Selenit- und ad-Selenat-Gruppe (Abbildung 4-14 A). Ein Unterschied hinsichtlich der PRDX6 mRNA-Konzentration zwischen den SeMet-Supplementierungen und dem Se-Mangel konnte nicht bestimmt werden. Die Proteinmenge von PRDX6 erhöhte sich durch alle Se-Supplementierungen im Vergleich zum Se-Mangel, wobei diese Erhöhung signifikant in der ad-Selenit-Gruppe im Vergleich zur Se-Mangel-Gruppe war (Abbildung 4-14 B). Auch in Bezug auf der Proteinmenge konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden SeMet-Gruppen bzw. im Vergleich der ho-SeMet-Gruppe zur Se-Mangel-Gruppe ermittelt werden.

Diese Ergebnisse der generellen Expression von PRDX6 nach Se-Supplementierung im murinen Kolongewebe geben einen Hinweis darauf, dass es durchaus zu einer Redox-Modifikation des PRDX6 kam, weil die Unterschiede im relativen Redoxstatus dieses Proteins nicht mit der zugrundeliegenden Proteinmenge an PRDX6 zusammenzuhängen scheint.

4.3 Ein GPx2-KO und/ oder eine Selenit-Supplementierung beeinflusst das Proteom in murinem Kolongewebe

Die GPx2 wird von epithelialen Geweben wie dem Kolon exprimiert. Zur weiteren Klärung der GPx2-Funktionen im murinen Kolongewebe wurde eine 2D-DIGE-Analyse des Kolons von GPx2-KO-Mäusen und den korrespondieren WT-Mäusen durchgeführt. Der GPx2-KO wurde vorher entsprechend bestätigt [187]. Im 2D-DIGE-Experiment wurden insgesamt acht Gele generiert. Auf dem Fusionsgelbild konnten nachfolgend insgesamt 895 Proteinspots auf dem murinen Kolonproteom detektiert werden. Von diesen Proteinspots waren 53 signifikant differentiell exprimiert (1,5-fach Hoch- oder Herunterregulation, p-Wert < 0,05). Mittels MALDI-TOF-MS konnten anschließend 21 eindeutige Protein-strukturen identifiziert werden (Abbildung 4-15, Tabelle 4-5).

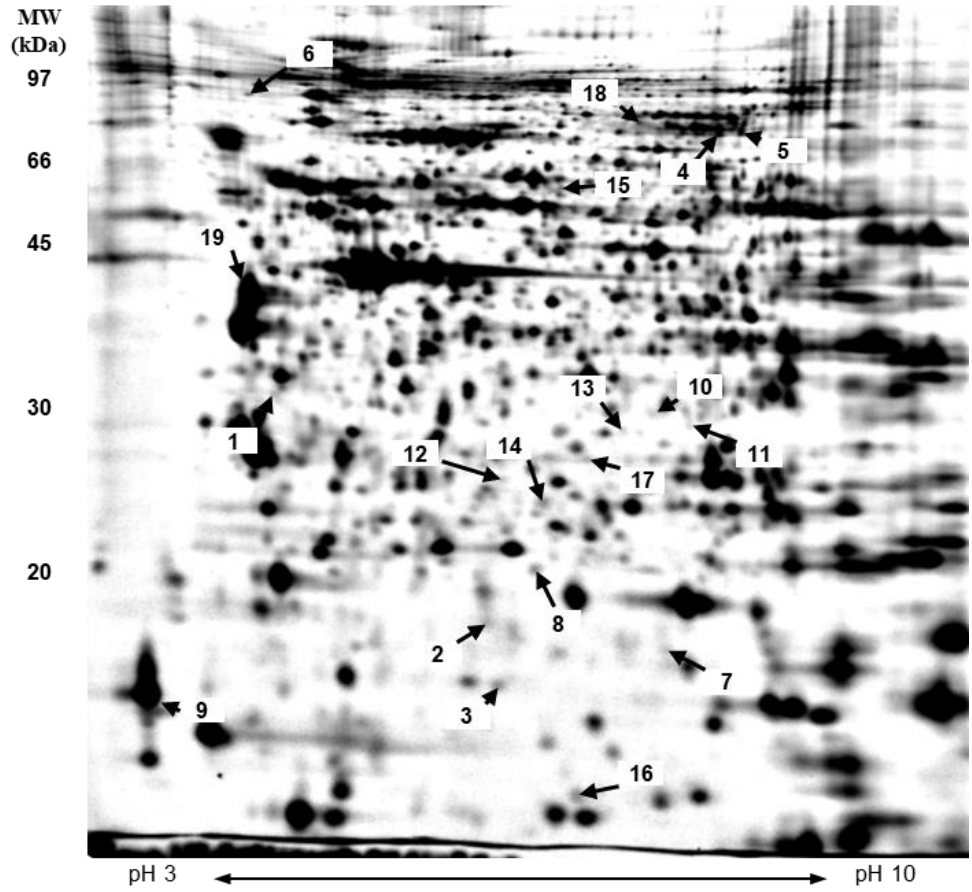

Abbildung 4-15: Ein GPx2 KO beeinflusst das Proteom von murinem Kolongewebe nach Se-Supplementierung.

Darstellung der signifikant differentiell exprimierten Proteinspots (Probe +Se WT), die wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben, selektiert und identifiziert wurden (siehe auch Tabelle 4-5).

Tabelle 4-5: Veränderungen im murinen Kolonproteom durch einen GPx2 KO.

Nr.	Proteinname	Gen	Uniprot ID	Masse (Da)	pI	Score	passende Peptide	Sequenzab-deckung (%)	-Se WT	-Se KO	+Se WT	+Se KO
	Antioxidative Aktivität (GO:0016209)											
19	**Peroxiredoxin6 (PRDX6)**	Prdx6	O08709	24969	5.71	72	7	38	1.00	1.36	0.65	0.79*
	Ligandbindung /-interaktion (GO:0005488)											
4	**Transthyretin (TTHY)**	Ttr	P07309	15880	5.77	61	7	44	1.00	1.34#	0.62*	0.71*
5	**Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B (AN32B)**	Anp32b	Q9EST5	31231	3.89	60	7	24	1.00	0.60#	0.57*	0.48
14	**Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP2 (NBP 2)**	Nubp2	Q9R061	29898	6.07	58	9	37	1.00	1.13	0.54*	0.58*
10	**Stathmin (STMN1)**	Stmn1	P54227	17264	5.76	55	8	44	1.00	1.07	0.50*	0.56*
24	**Heat shock protein HSP 90-beta (HSP84)**	Hsp90ab1	P11499	83571	4.97	95	15	22	1.00	0.87	1.40*	1.14
28	**Transgelin-2 (TAGL2)**	Tagln2	Q9WVA4	22552	8.39	58	6	46	1.00	1.20	0.52*	0.53*
33	**Calmodulin (CaM)**	Calm1	P62204	16827	4.09	58	6	53	1.00	0.74	1.27	0.96#
	Signalgeber (GO:0004871)											
2	**Dual specificity protein phosphatase 3 (DUS3)**	Dusp3	Q9D7X3	20687	6.07	64	9	50	1.00	1.18	0.57*	0.56*
	katalytische Aktivität (GO:0003824)											
8	**Protein kinase C gamma type (PKCγ)**	Prkcg	P63318	79562	7.27	56	11	16	1.00	1.52#	0.68*	0.67*
12	**NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial (NDUS3)**	Ndufs3	Q9DCT2	30302	6.67	60	6	22	1.00	1.22	0.58*	0.61*
16	**Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic (TXNRD1)**	Txnrd1	Q9JMH6	68239	7.42	62	12	22	1.00	1.08	1.51*	1.39
50	**Carbonyl reductase [NADPH] 3 (CBR3)**	Cbr3	Q8K354	31333	6.15	85	9	39	1.00	1.07	0.53*	0.54*
	Strukturmolekül (GO:0005198)											
25/26	**Tropomyosin alpha-1 chain (TPM1)**	Tpm1	P58771	32718	4.69	80	12	29	1.00	0.93	1.26	1.45*
						91	14	34	1.00	1.19	1.37#	1.55
20	**Prelamin A/C (LMNA)**	Lmna	P48678	74478	6.54	62	16	27	1.00	0.75	1.61	1.17*
52	**Keratin, type I cytoskeletal 19 (K1C19)**	Krt19	P19001	44515	5.28	86	11	39	1.00	0.64	0.94	0.86
	Transporter/ Elektronentransporter (GO:0005215/ 0045153)											
10/11	**Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial (CY1)**	Cyc1	Q9D0M3	35533	9.24	72	9	32	1.00	1.53#	0.61	0.61*
						84	10	35	1.00	1.34	0.16*	0.19*
15	**Calcium-activated chloride channel regulator 1 (CLCA1)**	Clca1	Q9D7Z6	100807	5.67	63	15	22	1.00	0.59#	1.34	1.18*
	Andere (ohne GO)											
6	**UPF0585 protein C16orf13 homolog (CP013)**	N/A	Q9DCS2	23015	6.10	99	9	58	1.00	0.94	0.41*	0.42*

Werte sind dargestellt als MW (n=4) im Verhältnis zur Se-Mangel Gruppe (-Se). Werte markiert mit # stellen signifikante Unterschiede zwischen WT und KO innerhalb der gleichen Se-Konzentration. Werte markiert mit * zeigen signifikante Unterschiede zwischen WT und KO im Vergleich zur entsprechenden Se-Mangel-Gruppe ($p < 0,05$; ANOVA). +Se, Selenit Supplementation (150µg Selenit/kg Diät).

Die meisten der identifizierten Proteine wurden hinsichtlich ihrer molekularen Funktion der GO-Gruppe Ligandbindung (35 %) zugeordnet. Dazu zählten *transthyretin* (TTHY), *acicic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B* (AN32B), *cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP2* (NBP2), Stathmin (STMN1), *heat shock protein HSP 90-beta* (HSP84), Transgelin (TAGL2) und Calmodulin (CaM). Des Weiteren zählten je 20 % der identifizierten Proteine zu den GO-Gruppen katalytische Aktivität bzw. Strukturmolekül (Abbildung 4-16 A).

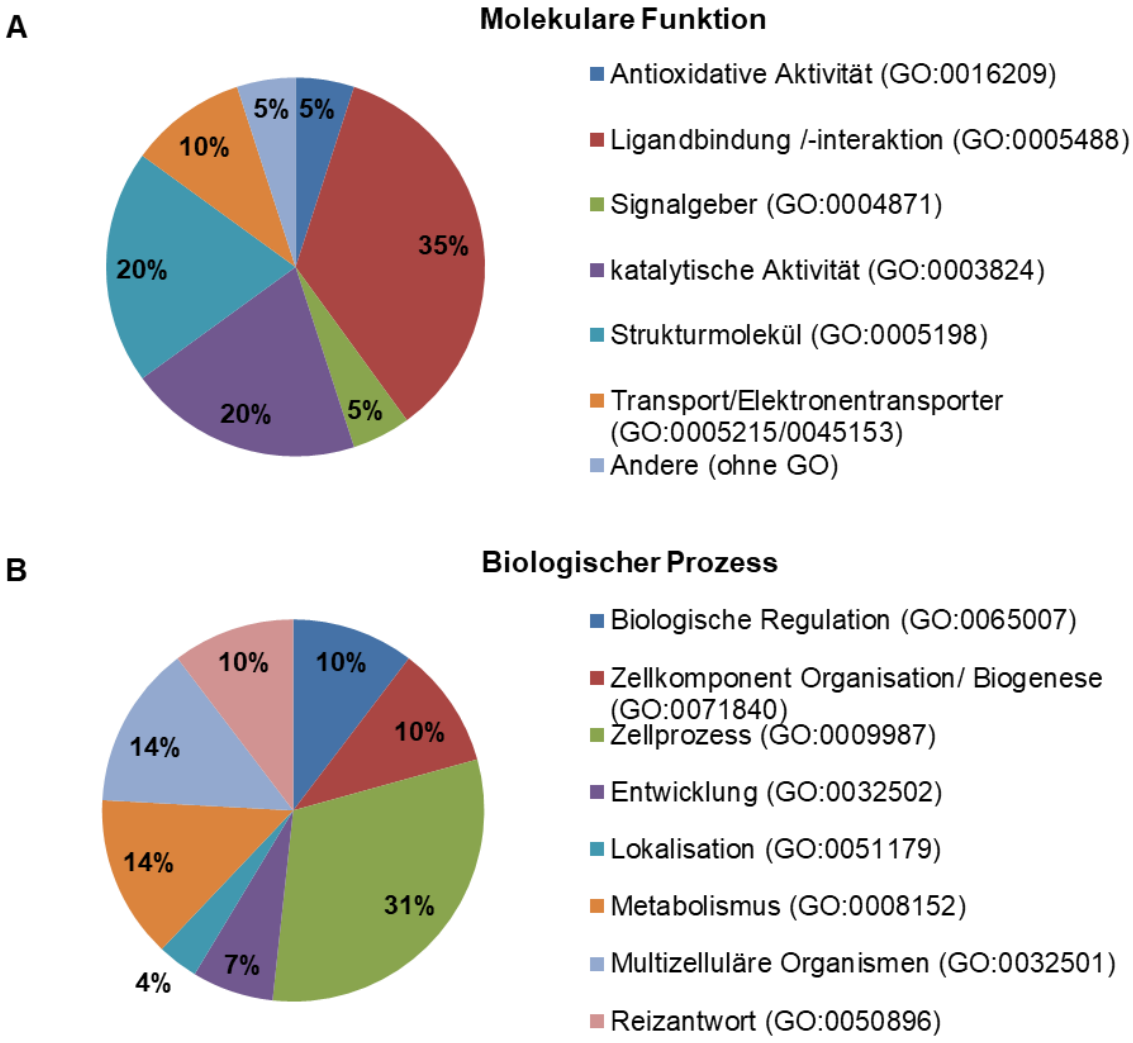

Abbildung 4-16: Klassifizierung differentiell exprimierter Proteine im murinen Kolongewebe beeinflusst durch den GPx2 KO.

Die Klassifizierung der signifikant identifizierten Proteinspots nach ihrer molekularen Funktion (A) und der Beteiligung an biologischen Prozessen (B) wurde mit Hilfe des PANTHER.org-Softwarewerkzeuges erstellt.

Die Klassifizierung der identifizierten Proteine nach ihrer Beteiligung an biologischen Prozessen ergab, dass 31 % der Proteine der GO-Gruppe Zellprozess, gefolgt von den GO-Gruppen Metabolismus (14 %) und multizelluläre Organismen (14 %) zugeordnet werden

konnten (Abbildung 4-16 B). Letztere stellen relevante biologische Prozesse, die von multizellulären Organismen durchgeführt werden dar.

Sowohl der GPX2 KO als auch die Selenit-Supplementierung hatten einen Effekt auf die Regulation der Proteine im murinem Kolongewebe. Hierzu zählen z.B. eine signifikant erhöhte Proteinmenge von TTHY, *protein kinase C gamma type* (PKCγ) und *cytochrome c1* (*heme protein, mitochondrial*; CY1) in der Se-Mangel-KO-Gruppe im Vergleich zu der Se-Mangel-WT-Gruppe. Eine signifikant verringerte Proteinmenge wurde in der Se-Mangel-KO-Gruppe für AN32B und *calcium-activated chloride channel regulator 1* (CLCA1) im Vergleich zur korrespondierenden Se-Mangel-WT-Gruppe detektiert. Zusätzlich konnte in den Se-supplementierten Gruppen eine signifikant verringerte CaM-Proteinmenge in der +SeKO-Gruppe im Vergleich zur +SeWT-Gruppe ermittelt werden.

Weiter zeigte sich für mehrere Proteine, wie z.B. für TTHY, *cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP2* (NBP2), Stathmin (STMN1), *dual specificity protein phosphatase 3* (DUS3) und *carbonyl reductase [NADPH] 3* (CBR3) eine signifikante Herunterregulation der entsprechenden Proteinmenge in den Se-supplementierten Gruppen (WT & KO) im Vergleich zur jeweiligen Se-Mangel-Gruppe. Die Proteinmenge des Selenoproteins TrxR1 erhöhte sich signifikant in der +SeWT-Gruppe im Vergleich zur Se-Mangel-WT-Gruppe. Bezüglich der Regulation von HSP84, LMNA und CLCA1 könnte zusätzlich ein Effekt des GPx2-KOs als auch der Se-Supplementierung vorliegen. Die Menge der drei genannten Proteine erhöhte sich durch die Se-Supplementierung, während der GPx2-KO die jeweilige Proteinmenge wieder verringerte. Dies wurde jedoch nicht in allen Fällen als signifikant reguliert detektiert (Tabelle 4-5).

4.3.1 Validierung ausgewählter Zielstrukturen

Nachfolgend an die 2D-DIGE-Analysen wurde während der Validierung der Fokus auf CLCA1 gelegt, das von Becherzellen sekretiert wird und in verschiedene zelluläre Prozesse wie Differenzierung involviert ist [188,189]. Diese Validierungsexperimente wurden von Claudia Lennicke durchgeführt. Dabei konnte die signifikant verringerte Proteinmenge von CLCA1 in den Se-Mangel-KO-Gruppen mittels Western Blot bestätigt werden. Dies ging folgend mit einer signifikant verringerten mRNA-Konzentration von Clca1 und weiteren Clca-Isoformen einher [187].

Bei der Durchführung der Zellkulturexperimente mit humanen Kolonkarzinom-Zelllinien ergab sich eine Hypothese hinsichtlich eines möglichen Effektes der GPx2 auf die Regulation der Zielproteine (siehe Kapitel 4.1.1.2). Hierbei zeigte sich bezüglich der GPx2 mRNA-Konzentrationen eine signifikante 500-fache Erhöhung der GPx2 mRNA-Menge in

den HT-29-Zellen im Vergleich zu den HCT116- und Colo320-Zellen (Abbildung 4-6). Außerdem konnte ebenfalls in den HT-29-Zellen eine signifikant erhöhte mRNA-Konzentration von insbesondere ABHD14B, ANXA2, LMNA und CFL1 (Zielstrukturen im murinen Kolongewebe des 20-wöchigen Se-Fütterungsversuches) im Vergleich zu den anderen beiden Kolonkarzinom-Zelllinien detektiert werden (Abbildung 4-7). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der GPx2 Expression und der mRNA-Expression der genannten Zielstrukturen zu überprüfen, wurden diese in den murinen GPx2-KO-Kolongeweben ermittelt (Abbildung 4-17).

Während sich die mRNA-Konzentration von Anxa2 und Cfl1 nicht signifikant durch den GPx2-KO in murinem Kolongewebe änderte (Daten nicht gezeigt), zeigte sich eine signifikant reduzierte Abhd14b mRNA-Konzentration in der Se-Mangel-KO-Gruppe im Vergleich zur Se-Mangel-WT-Gruppe. In den Se-supplementierten Gruppen ist dieser Unterschied tendenziell aber nicht signifikant (Abbildung 4-17 A).

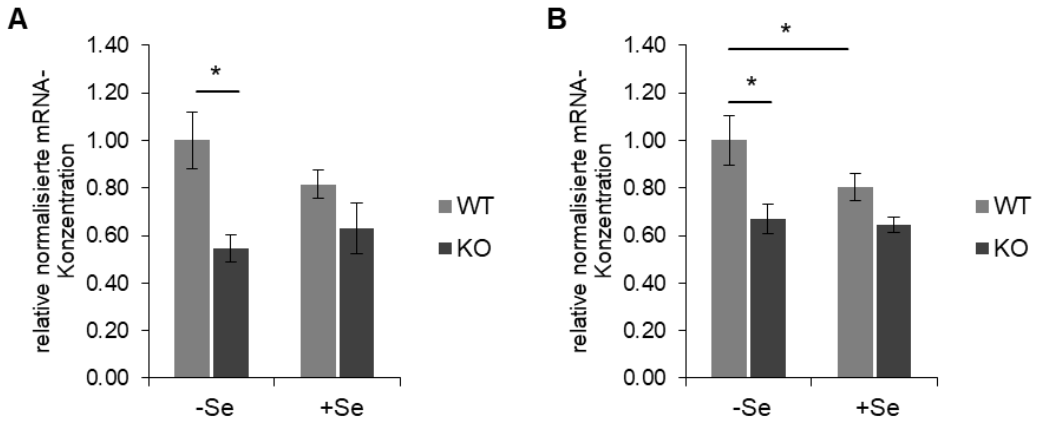

Abbildung 4-17: Einfluss des GPx2 KO auf die mRNA-Expression von Abhd14b und Lmna in murinem Kolongewebe.

Die mRNA-Konzentrationen von (A) Abhd14b und (B) Lmna wurden wie im Kapitel 3.3.3 beschrieben bestimmt (n=9). Dargestellt sind MW ± SEM relativ zu Se-Mangel-WT Gruppe. Balken markiert mit einem * stellen signifikante Unterschiede dar ($p < 0,05$; ANOVA). Abhd14b, *Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 14B;* LMNA, Prelamin A/C.

Lmna stellte sowohl im 20-wöchigen- als auch im GPx2-KO Se-Fütterungsversuch eine Zielstruktur dar. Die Lmna mRNA-Konzentration reduzierte sich signifikant in der Se-Mangel-KO- und +SeWT-Gruppe im Vergleich zur Se-Mangel-WT-Gruppe. Des Weiteren konnte die erhöhte Expression, welche sich auf Proteinebene im 2D-DIGE-Experiment des murinen Kolongewebes durch Se-Supplementation aufzeigte, in Bezug auf die Lmna mRNA-Konzentration nicht bestätigt werden (Abbildung 4-17 B).

5 DISKUSSION

5.1 Identifizierung neuer Se-regulierter Proteine im murinen Kolongewebe

In der vorliegenden Arbeit wurde der Gel-basierte proteomische Ansatz der 2D-DIGE in Verbindung mit MALDI-TOF-MS zur Detektion von differentiell exprimierten Proteinen in murinem Kolongewebe nach Se-Supplementierung eingesetzt. Zum einen stellt diese Methode eine sehr effektive Möglichkeit zur Proteinauftrennung dar, und zum anderen ist die Expertise bezüglich der Anwendung der 2DE als auch 2D-DIGE im Institut für Medizinische Immunologie durch vielfältige Veröffentlichungen belegt [163,190–194].

Insgesamt konnten 23 der differentiell exprimierten Proteine eindeutig identifiziert werden. Hinsichtlich des Einflusses auf die Regulation der Proteinmenge zeigten die in den Fütterungsversuchen eingesetzten Se-Verbindungen Selenit, Selenat und SeMet jeweils einen heterogenen Effekt. Die meisten differentiell exprimierten Proteine konnten gemäß ihrer molekularen Funktion der GO-Gruppe Ligandbindung/-interaktion zugeordnet werden (Abbildung 4-2). Hierzu gehörte u.a. ANXA2, ein bekanntes Phospholipid-bindendes Protein, welches auch als Redox-Sensor fungiert [195] und dessen Proteinmenge durch ho-Selenat und beide SeMet-Supplementierungen im Vergleich zum Se-Mangel-Zustand signifikant verringert wurde (Tabelle 4-1). Interessanterweise ist eine Herunterregulation von ANXA2 mit einer Verbesserung von Darmentzündungen assoziiert. Eine verminderte Proteinmenge von ANXA2 unterdrückt dabei zum einen die Tumornekrosefaktor-α (TNF-α)-Spaltung und fördert zum anderen die Spaltung von Liganden des EGF-Rezeptors (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) wie Amphiregulin (AREG) und *Proheparin-binding EGF-like growth factor* (HB-EGF). Dies führt schließlich zu einer Induktion der Zellproliferation und trägt zur Reparatur des intestinalen Schleimhautgewebes bei [196]. Hiller *et al.* postulieren in diesem Zusammenhang nach Untersuchung eines Dextransulfat-Natrium (DSS)-Colitis-Mausmodels mit Supplementation von Selenit bzw. SeMet vergleichend zu einem milden Se-Mangel, dass insbesondere bei schweren Formen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) Se anti-inflammatorische Effekte aufzeigt [197].

Aus physiologischer Sicht scheint Se nicht nur durch die Regulation von ANXA2 sondern auch durch den Einfluss auf die Proteinmenge von *Growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2), das mit dem EGFR interagiert [198], einen positiven Einfluss bezüglich der Zellproliferation des murinen Kolongewebes im Vergleich zu Se-Mangel-Verhältnissen zu haben.

So führten sowohl eine ad-Selenit- als auch eine ad-SeMet-Supplementation zu einer signifikant erhöhten GRB2 Proteinmenge im Vergleich zum Se-Mangel, während eine ho-

SeMet-Supplementation diese im Vergleich zur korrespondierenden ad-SeMet Gruppe signifikant verringert (Tabelle 4-1). Nach EGFR-Stimulierung wird unter Mitwirken von GRB2 der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg und somit die Zellproliferation induziert [199]. Zukünftige Untersuchungen zu physiologischen Effekten der Se-Verbindungen oder auch der Selenoproteine könnten das Verständnis der Mechanismen erweitern, über die Se die Proliferation von Zellen im Kolongewebe beeinflusst, da z.B. bereits eine Beteiligung von GPx2 an der mukosalen Homöostase beschrieben wurde [40].

Ein weiteres identifiziertes Protein mit Ligand-bindenden Funktionen war COF1, dessen Proteinmenge im murinen Kolongewebe insbesondere durch ho-Selenat und ho-SeMet-Supplementationen im Vergleich zum Se-Mangel signifikant erhöht wurde (Tabelle 4-1). Zusätzlich konnte die signifikant erhöhte COF1-Proteinmenge in der ho-SeMet-Gruppe im Vergleich zur korrespondierenden ad-SeMet-supplementierten Gruppe zumindest tendenziell auch mittels Western Blot bestätigt werden (Abbildung 4-4 A). COF1 gehört zur ADF (*actin depolymerizing factor*)/ Cofilin-Proteinfamilie und spielt eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Aktindynamik, katalysiert die Aktinpolymerisation als auch –depolymerisation, ist beteiligt an diversen Zellprozessen und in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert [200]. Von der genannten Proteinfamilie ist COF1 am häufigsten vertreten und kommt ubiquitär in nicht-Muskel-Gewebe vor. Mittels eines 2DE-basierten Ansatzes konnten Fu *et al.* nach Behandlung von HeLa-Zellen (Zelllinie, die aus einem Gebärmutterhalskarzinom etabliert wurde) mit 40 µmol/l Selenit eine erhöhte COF1 Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle detektieren [160]. Dagegen zeigte eine Selenit-Supplementierung im murinen Kolongewebe keinen Effekt auf die COF1 Proteinmenge im Vergleich zum Se-Mangel (Tabelle 4-1). Dies könnte sich auf die unterschiedlichen Modelle (*in vivo* versus *in vitro*) bzw. dem analysierten Zelltyp (Kolongewebe *versus* HeLa-Zellen) zurückführen lassen. In einer weiteren *in vitro*-Studie erhöhte sich nach Behandlung der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie LNCaP mit SeMet und anschließender 2DE-Analyse die Proteinmenge von COF2, einem weiteren Vertreter der ADF/Cofilin-Familie [201].

Die Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass durch Se die Expression der gesamten ADF/Colfilin Familie und das auch in verschiedenen Zelltypen/Geweben beeinflusst wird und somit Se eine Rolle in der Aktin- bzw. Zytoskelett-Regulation spielen könnte.

Es ist bekannt, dass die Selenoproteine SELENON und SELENOK (Tabelle 1-1) an der Regulation der Calcium-Homöostase, die eine zentrale Rolle innerhalb der Signaltransduktion eines Organismus einnimmt, beteiligt sind. Das Calciumion (Ca^{2+}) stellt hierbei einen der am häufigsten vorkommenden Botenstoffe (*second messenger*) dar und spielt eine wesentliche Rolle bei fundamentalen Prozessen der Zellphysiologie

einschließlich der Genexpression, Zellzykluskontrolle, Zellmotilität, Autophagie sowie Apoptose [202]. Insgesamt vier der durch Se-Supplementierung differentiell regulierten Proteine des murinen Kolongewebes sind am Ca^{2+}-Stoffwechsel beteiligt, entweder durch die Bindung von Calcium-Ionen wie im Falle von Calmodulin (CaM) sowie der *Calpain small subunit 1* (CSS1) oder dadurch, dass deren Funktion Calcium-abhängig ist wie bei ANXA2 und dem CLCA1.

Die Proteinmenge von CLCA1 wurde insbesondere durch ho-Selenit und ho-SeMet Supplementierung im Vergleich zum Se-Mangel signifikant erhöht (Tabelle 4-1), was sich bei nachfolgender Validierung mittels Western Blot-Analyse in der ho-SeMet-Gruppe bestätigte (Abbildung 4-4 B). CLCA1 wird von Becherzellen des GIT sekretiert und ist in großer Menge im intestinalen Schleim (Mucus) enthalten [189,203] , welcher die Darmschleimhaut vor Austrocknung sowie fremden Partikeln schützt und zusätzlich dafür sorgt, dass Mikroorganismen oder Schadstoffe abtransportiert werden können [204]. Ferner wird postuliert, dass die Aktivierung von CLCA1 wesentlich für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen Differenzierung und Proliferation von Enterozyten ist [205].

Ein Se-Mangel kann über verschiedene Mechanismen, wie beispielsweise der Induktion des NFκB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*)-Signalweges oder einer erhöhten ROS-Menge durch die Reduktion anti-oxidativer Selenoproteine zu einer Entzündung des Darmes führen [206]. In diesem Zusammenhang ist auch das *Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 14B* (ABHD14B) zu nennen, dessen Proteinmenge auf den 2D-DIGE-Gelen sowohl im murinen Kolongewebe (Tabelle 4-1) als auch im Lebergewebe derselben Mäuse [163] signifikant durch alle Se-Supplemente im Vergleich zum Se-Mangel erhöht wurde. ABHD14B ist auch bekannt als der Transkriptionsfaktor *CCG1 (cell cycle arrest in G1)-interacting factor B* (CIB) [207], dessen Funktion neben einer Hydrolase-Eigenschaft bis jetzt jedoch noch nicht völlig charakterisiert wurde. Eine Analyse der Datenbank *Reactome.org* (https://reactome.org/PathwayBrowser/#R-HSA-156584&FLG=Q96IU4) zeigte zusätzlich auf, dass ABHD14B an Prozessen des Phase- II-Metabolismus beteiligt ist. Diese führen über Konjugationsreaktionen zur Biotransformation von endogenen Verbindungen oder Fremdstoffen und ermöglichen dadurch eine bessere Ausscheidung dieser Moleküle [208]. ABHD14B ist insbesondere an der Sulfonierung kleiner Moleküle beteiligt, die eine wichtige PTM darstellt [209]. Der Mucus des GIT trägt u.a. sulfonierte Kohlenhydrate [210] und eine reduzierte Menge an sulfoniertem Mucus ist mit Erkrankungen des GIT assoziiert [210,211].

Die Veränderung der Mucus-Zusammensetzung durch die verminderte Proteinmenge von CLCA1 als auch ABHD14B unter Se-Mangel-Konditionen im Vergleich zu den Se-Supplementierungen könnte entzündliche Prozesse im GIT unterstützen bzw. fördern.

Warum insbesondere die supranutritiven Supplementierungen mit Selenit und SeMet die CLCA1-Proteinmenge bzw. alle Se-Supplemente die Proteinmenge von ABHD14B signifikant im murinen Kolongewebe im Vergleich zum Se-Mangel erhöhten sowie der mögliche Zusammenhang mit einer anti-inflammatorischen Wirkung von Se sollte zukünftig in weiterführenden Studien untersucht werden.

5.1.1 Einfluss des GPx2 KO

Zusätzlich zu dem 20-wöchigen Se-Fütterungsversuch mit C57BL/6j-Mäusen wurde ebenfalls die Rolle der GPx2 unter Verwendung eines GPx2 KO-Mausmodels mit entsprechenden WT-Mäusen mittels der 2D-DIGE-Technik untersucht.

Eine vergleichende Betrachtung der identifizierten Proteine zeigte auf, dass insgesamt fünf Proteine in beiden Systemen als differentiell reguliert detektiert wurden (Abbildung 5-1). Dazu zählen die Proteine CaM, TXNRD1, CBR3, LMNA und CLCA1. Auffällig war, dass sich die Proteinmenge insbesondere von LMNA und CLCA1 im Se-Fütterungsversuch der GPx2 KO- bzw. WT -Mäuse nicht nur durch den GPx2 KO, sondern auch durch eine Selenit-Supplementierung signifikant änderte (Tabelle 4-5).

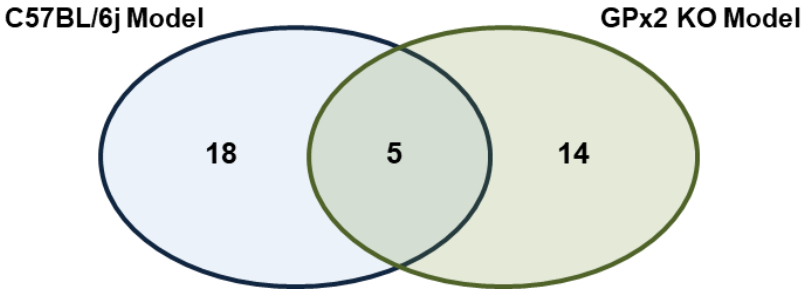

Abbildung 5-1: Venn-Diagramm differentiell exprimierter Proteine.

Anzahl an Proteinen die entweder durch eine Se-Supplementierung (C57BL/6j-Model) und/oder einen GPx2 KO (GPx2 KO-Model) differentiell in murinem Kolongewebe exprimiert wurden.

Die Proteinmenge von CLCA1 wurde wie bereits im 20-wöchigen Fütterungsversuch gezeigt (Tabelle 4-1), durch Se-Supplementierung in der +SeWT-Gruppe im Vergleich zur Se-Mangel-WT-Gruppe erhöht. Zusätzlich führte der GPx2 KO in beiden Versuchsgruppen (Se-Mangel/ +Se) zu einer geringeren CLCA1-Proteinmenge im Vergleich zu korrespondierenden WT-Gruppe (Tabelle 4-5).

CLCA1, einem Protein welches von Becherzellen sekretiert wird, werden anti-proliferative Eigenschaften zugeschrieben. Zudem ist es an der spontanen Differenzierung der humanen KRK-Zelllinie CaCo-2 beteiligt [205]. Ein CLCA1 *knock down* führte in sich differenzierenden CaCo-2-Zellen zu einer starken Herunterregulation von β-Catenin [205], einem zentralen Molekül des Wnt-Signalweges, der die intestinale epitheliale

Differenzierung reguliert [212–214]. Da die GPx2 ebenfalls über den Wnt-Signalweg reguliert wird [60,61] und ein GPx2 KO im murinen Kolongewebe zu einer verringerten CLCA1 Proteinmenge führte könnte dies ein möglicher Mechanismus sein, über den die GPx2 an der mukosalen Homöostase beteiligt ist [40].

Ähnlich wie die Menge an CLCA1-Protein wurde die Proteinmenge von LMNA durch den GPx2 KO (↓) und die Selenit-Supplementierung (↑) beeinflusst. LMNA ist eine Komponente der nukleären Lamina, einem Netzwerk das mit der inneren Zellkernmembran assoziiert ist [215]. Neben dieser strukturellen Funktion von LMNA gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass die nukleäre Lamina die Genexpression modulieren kann und dies entweder über eine direkte Interaktion mit Chromatin oder durch Bindung von transkriptionellen Regulatoren in der Kernperipherie erfolgt [216–218]. Außerdem ist die Lamina involviert in verschiedene zelluläre Prozesse wie z.B. der Signaltransduktion, der Zellzyklus-Kontrolle oder der DNA-Reparatur [219,220]. Des Weiteren wird LMNA eine Rolle in der Differenzierung von verschieden Zelltypen wie z.B. Myoblasten [221], adipogenen Zellen [222], humanen und murinen embryonalen Stammzellen [223] sowie Neuroblastom-Tumorzellen [224] zugeschrieben, wobei auch hierbei die Regulation von Elementen des Wnt/ β-Catenin Signalweges beteiligt ist [225]. Somit sind sowohl CLCA1 als auch LMNA, welche beide GPx2 und Se-abhängig im murinen Kolongewebe reguliert wurden, potenziell an Differenzierungsprozessen des intestinalen Gewebes beteiligt. Dies erweitert das bisher bekannte Wissen über die Rolle der GPx2 im Darm.

Im Zusammenhang mit den durchgeführten 2D-DIGE-Analysen von murinen Kolon-gewebe nach einer Se-Supplementierung konnte festgestellt werden, dass bis auf die TXNRD1 kein weiteres Selenoprotein wie z.B. GPx1 oder GPx2 als differentiell reguliert identifiziert wurden. Und dies, obwohl neben der GPx-Enzymaktivität auch die GPx2 Proteinmenge in den Se-supplementierten Gruppen im Vergleich zur Se-Mangel-Gruppe sowohl in dem initialen 20-wöchigen Fütterungsversuch als auch im GPx2 KO Model signifikant erhöht war [187,226].

Das Selenoproteom stellt bei Betrachtung des Gesamtproteomes eines Organismus lediglich einen sehr geringen Anteil dar [70,227], sodass sogar die mit am höchsten exprimierten Selenoproteine GPx1 und GPx2 unterhalb des Detektionslimits der 2D-DIGE-Technik liegen könnten [161]. Allerdings lag der Fokus in der vorliegenden Arbeit weniger darauf, die Regulation einzelner Selenoproteine im murinen Kolongewebe zu untersuchen, sondern darauf neue Se-regulierte Proteine zu finden. Jedoch wird durch die geringe Anzahl an Detektionen von Selenoproteinen ein möglicher Nachteil der 2D-DIGE deutlich. So kann es trotz vieler Vorteile der 2D-DIGE wie u.a. der Reduktion von Gel-zu-Gel Variationen oder der Möglichkeit, bis zu vier Proben zusammen auf einem 2D-Gel

auftrennen zu können, durchaus auch zur Unterrepräsentation bestimmter Proteinarten kommen, insbesondere wenn diese in geringen Mengen vorhanden sind, wie im Falle der Selenoproteine (Tabelle 5-1).

Tabelle 5-1: Vor- und Nachteile 2D-DIGE basierter Proteomuntersuchungen.

Vorteile	Nachteile
• robuste Proteinauftrennung • schnelle, kosteneffektive und reproduzierbare Methodik für die Analyse zusammenhängender Proteinproben • Kompensation von Gel-zu-Gel-Variationen durch IPS und Co-Auftrennung auf einem 2D-Gel • Verwendung hoch-sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe mit einem großen Dynamikbereich für Detektion von Proteinen • Durchführung von multiplen Analysen durch die Möglichkeit der Kombination mit distinkten • Identifizierung von PTM • Direkte Visualisierung differentiell exprimierter Proteine über Intensitätsunterschiede • Hinweise auf Charaktereigenschaften von Proteinen durch Kombination von pI-Werten und der relativen molekularen Masse	• Unterrepräsentation verschiedener Proteinarten: ○ sehr hydrophobe Proteine sowie Proteine, die in geringen Mengen vorkommen ○ Proteine mit hoher/sehr geringer molekularer Masse (<10 kDa; >150 kDa) ○ Proteine mit extrem geringen bzw. hohen pI-Werten (<3; >11) • eingeschränkte Auftrennung von Proteinkomplexen aufgrund entstehender Schlieren auf dem 2D-Gel • Eventuelle Verarmung von Reduktionsäquivalenten im stark alkalischen Bereich (DTT-Verlust) • Mögliche Komplikationen während der MS-basierten Identifikation durch eine heterogene Zusammensetzung der Proteinspots

Modifiziert nach [149]. PTM, post-translationale Modifikationen.

5.1.2 Übertragbarkeit muriner Ergebnisse auf das humane System

Grundsätzlich werden viele Experimente mit Zellen oder Tiermodellen durchgeführt um das prinzipielle Verständnis wichtiger Prozesse, wie beispielsweise Proliferation, Differenzierung, Metabolismus sowie Apoptose zu erweitern. Jedoch stellt sich am Ende eines Experimentes meist die Frage, ob die Ergebnisse auch im menschlichen Organismus erwartet werden können oder lediglich in dem untersuchten Modell-System eine Rolle spielen. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene als differentiell

exprimiert definierte Zielproteine, die sich als durch Se reguliert erwiesen, auch hinsichtlich ihrer Expressionsmuster unter Einfluss einer Se-Behandlung in humanen Kolonkarzinom-Zelllinien untersucht.

Hierfür wurden zum einen die Kolonkarzinom-Zelllinien HCT116 und HT-29, welche epithelialem Ursprungs sind sowie die undifferenzierte Zelllinie endokrinen Ursprungs Colo320 verwendet [228]. Insbesondere HCT116 sowie HT-29 wurden bereits in anderen Studien hinsichtlich der Selenoproteinexpression oder des Einflusses einer Se-Behandlung untersucht [139,144,229–231]. Ein Vergleich der GPx2-Expression der drei Zelllinien wies auf eine bis zu 500-fach erhöhte GPx2-mRNA Menge in den HT-29-Zellen im Vergleich zu HCT116- und Colo320-Zellen hin (Abbildung 4-6). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Feststellung, dass eine hohe GPx2-Expression mit einem hohen Differenzierungsgrad von KRK korreliert [232] und somit ein hoher Differenzierungsgrad des der HT-29-Zellen zugrundeliegenden Tumors vermutet werden kann. Die mRNA-Menge der GPx2 konnte in der vorliegenden Arbeit in den Colo320-Zellen kaum detektiert werden, womit sich die undifferenzierte Eigenschaft der Colo320-Zelllinie bestätigte.

Im murinen Kolongewebe wurde durch Se-Supplementierung die ANXA2-Proteinmenge im Vergleich zum Se-Mangel verringert (Tabelle 4-1). Eine verringerte mRNA-Konzentration durch Se-Behandlung (0,5 µM Selenite/ 25 µM Selenat) im Vergleich zur Kontrolle konnte zwar in HCT116-Zellen bestätigt werden, jedoch zeigte sich in HT-29-Zellen ein eher gegenteiliger Effekt, der mit erhöhten ANXA2 mRNA-Spiegeln nach 0,5 µM Selenit- sowie mit 50 µM SeMet-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle einherging (Tabelle 4-3).

Einer Herunterregulation von ANXA2 wird eine mögliche Rolle in der Prävention einer KRK-Entwicklung durch Limitierung Tumor-bezogener Prozesse wie Krebszelladhäsion, Neovaskularisation, Invasion sowie Metastasierung zugeschrieben [233]. Es ist jedoch zu beachten, dass die Effekte von Se im murinen Kolongewebe im Vergleich zu einer Se-Mangel-Situation entstanden sind und das verwendete FKS im Zellkulturmedium eine geringe Menge an Se enthält. Eine FKS-reduzierte oder FKS-freie Kultivierung der Zellen wurde nicht vorgenommen, da dies bereits einen großen Einfluss auf das Wachstum sowie auf die mRNA- oder Proteinregulation der Zellen haben kann. Die möglichen Se-Konzentrationen des Zellkulturmediums könnten der Grund dafür sein, dass kein Effekt der Se-Behandlung auf die mRNA Expression der Selenoproteine in den humanen Kolonkarzinom-Zelllinien gefunden werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Eine ähnliche Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der murinen Se-Fütterungsversuche im Vergleich zu den Zellkulturexperimenten mit humanen Kolonkarzinom-Zelllinien konnte für die Proteine COF1 und LMNA ermittelt werden. Während die Proteinmenge von COF1

bzw. LMNA im murinen Kolongewebe nach Se-Supplementierung erhöht war (Tabelle 4-1, Abbildung 4-4), verringerte sich die Proteinmenge von COF1 in Colo320-Zellen nach Behandlung mit 2,5 µM Selenit sowie mit 5 µM oder 25 µM Selenat. Ebenso verringerte sich die Proteinmenge von LMNA in HT-29-Zellen durch 5 µM und 25 µM Selenat-Behandlung (Abbildung 4-8, Abbildung 4-9). In der Literatur wird eine erhöhte Expression von COF1, welches eine Rolle in der Aktindynamik spielt, mit einer erhöhten Tumorinvasion und Metastasierung assoziiert [234,235] und als tumortherapeutische Zielstruktur in Betracht gezogen wird [236]. Die Rolle von LMNA, einem Strukturprotein der Zellkernlamina, im KRK wird kontrovers diskutiert. Zum einen werden erhöhte LMNA-Level mit Tumorentstehung sowie -progression und vermehrter Metastasenbildung in Zusammenhang gebracht [237,238] und zum anderen wurde eine reduzierte LMNA Proteinmenge mit einem erhöhten Auftreten von KRK-Rezidiven beschrieben [239], was somit eher auf eine Tumor-suppressive Eigenschaft hindeuten würde.

Aus den in dieser Arbeit gewonnen Daten lässt sich schließen, dass bei der Analyse der Effekte von Se das nicht nur das zugrundeliegende Modelsystem im Fokus stehen sollte, sondern auch die verwendete Se-Verbindung entscheidend ist.

Die organische Se-Verbindung SeMet vertrugen die untersuchten humanen Kolonkarzinom-Zelllinien in viel höheren Konzentrationen als beispielsweise Selenit und dennoch hatten 0,5 µM Selenit und 50 µM SeMet annähernd den gleichen Effekt auf die ANXA2 mRNA-Menge in HT-29-Zellen. Dies unterstreicht die Hypothese, dass zelluläre Reaktionen sowohl abhängig von der Se-Konzentration als auch von den jeweiligen Se-Verbindungen (organisch/ anorganisch) sind. So scheint es, dass die Se-Verbindungen durch die Regulation von u.a. ANXA2 (↓), COF1 (↑) oder LMNA (↑) im murinen Kolongewebe im Vergleich zu Se-Mangel-Konditionen einen positiven Effekt auf die generelle Zellphysiologie ausüben. Allerdings könnten die gleichen Se-Verbindungen in humanen Kolonkarzinomzellen einen weitestgehend gegenläufigen Effekt auf die Regulation der genannten Zielstrukturen (ANXA2 (↓↑), COF1 (↓), LMNA (↓) haben, der somit möglicherweise dem Beseitigen der Tumorzelle dienen könnte.

Abschließend lässt sich kaum einschätzen, welchen Einfluss der veränderte Metabolismus einer Tumorzelle auf die Ausbildung von Se-Metaboliten hat und in welchem Maße sich diese von denen in „gesunden“ Kolonzellen unterscheiden. Um diese Hypothese zu überprüfen könnte nachfolgend in einem *in vivo*-KRK-Tumormodel eine Se-Supplementierung erfolgen, wobei sich anschließende Analysen nicht nur auf das Tumorgewebe, sondern auch auf das normale Kolongewebe konzentrieren sollten.

5.2 Se und das Redox-System im murinen Kolongewebe

Die physiologischen Funktionen von Se werden meist durch die Aktivität der Selenoproteine ausgeübt und die Aktivitäten verschiedener Selenoproteine sind akzeptierte Marker für den Se-Status in Geweben [109].

Im 20-wöchigen Fütterungsversuch war die totale GPx-Aktivität im murinen Kolongewebe mehr als 10-fach in der Se-Mangel-Gruppe reduziert im Vergleich zu den Se-supplementierten Gruppen, was auf einen wirksamen Se-Mangel in der Kontrollgruppe hinweist. Zusätzlich waren die mRNA-Konzentrationen der GPx2 nicht signifikant zwischen den Versuchsgruppen verändert (siehe Anhang: Tabelle A-1). Dies stimmt mit dem beschriebenen Konzept der Hierarchie der Selenoproteine überein, das auf eine unterschiedliche Expression der Selenoproteine in Abhängigkeit vom verfügbaren Se hinweist und in dem der GPx2 ein hoher Rang zugeschrieben wird [46]. Des Weiteren wurde die GPx2-Proteinmenge im murinen Kolongewebe am stärksten durch die ho-SeMet-Supplementierung im Vergleich zum Se-Mangel, der ad-SeMet sowie den ho-Selenit- und –Selenat-Gruppen erhöht (siehe Anhang Abbildung A-1). Dies könnte durch eine effektive Absorptionsrate mittels aktiven transzellulären Transport [13,17,18] sowie durch die organische Beschaffenheit von SeMet erklärt werden.

Da unter Se-Mangel-Konditionen das Se-abhängige Glutathionperoxidase-Systems herunterreguliert ist, wird der intrazelluläre Redoxstatus zu einem mehr oxidierten verschoben [240]. Dadurch kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors (TF) *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* (Nrf2) [241]. Nrf2, einer der zentralsten Regulatoren der anti-oxidativen Abwehr sowie von Phase-II-Entgiftungsprozessen, ist unter physiologischen Bedingungen im Zytoplasma lokalisiert und an das Protein *Kelch-like ECH-associated protein 1* (KEAP1) gebunden. Unter oxidativem Stress wird die Bindung von Nrf2 zu KEAP1 aufgelöst, wodurch Nrf2 in den Zellkern translozieren kann. Mit Bindung des TF an das *antioxidant respones element* (ARE) im Promotor verschiedener zytoprotektiver Gene wird deren Expression aktiviert [242].

Neben den Selenoproteinen GPx2 und TXNRD gehören auch die PRDX oder die Glutathion-S-Transferasen (GSTs) zu den zahlreichen Zielgenen von Nrf2 [241]. PRDX5, welches auch von Nrf2 reguliert wird [243] war das einzige nicht Se-abhängige anti-oxidative Protein dessen Proteinmenge signifikant im murinen Kolongewebe nach 20-wöchiger Fütterung mit ad-Selenat sowie ad-SeMet Supplementierung im Vergleich zum Se-Mangel verringert war (Tabelle 4-1).

Im Gegensatz dazu konnte kürzlich in Lebergeweben desselben Se-Fütterungsversuches eine signifikant verringerte GSTm1 und GSTpi1 Transkript- sowie Proteinmenge und totale

GST-Enzymaktivität in den Se-supplementierten Gruppen im Vergleich zum Se-Mangel detektiert werden [163]. Eine Regulationsveränderung der Transkripte zwischen den Versuchsgruppen der genannten GSTs konnte jedoch im murinen Kolongewebe nicht gefunden werden (siehe Anhang: Tabelle A-2). Dies könnte auf einen generellen Unterschied hinsichtlich des Redoxstatus zwischen den Organen Leber und Kolon hinweisen, dessen Ausprägung sowie molekulare Ursachen interessante Aspekte für zukünftige Untersuchungen sind.

5.2.1 Veränderungen im Protein-Redoxstatus durch Se-Supplementierungen

Um den Einfluss der Se-Verbindungen auf den Redoxstatus von Proteinen im murinen Kolongewebe zu analysieren wurde in der vorliegenden Arbeit eine Variante der Redox-DIGE entwickelt, in der für jede Probe zwei Subproteome generiert wurden. Nach Bildung des Verhältnisses aus direkter (reduzierte Thiole) und indirekter Markierung (oxidierte Thiole) konnte in Abhängigkeit zur jeweiligen Se-Verbindung eine Aussage über den Redoxstatus der identifizierten Proteine geschlossen werden. Von den insgesamt 13 identifizierten Proteinen war in den meisten Fällen der relative reduzierte Proteinstatus in den Se-supplementierten Gruppen im Vergleich zum Se-Mangel erhöht (Tabelle 4-4). Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass es unter Se-Mangel-Konditionen zu einer Verschiebung des intrazellulären Redoxstatus hin zu einem mehr oxidierten Milieu kommt [240]. Diese Verschiebung scheint jedoch vorrangig in einem physiologischen Bereich zu liegen, da zuvor beschriebene anti-oxidative Abwehrsysteme wie beispielsweise über den TF Nrf2 im murinen Kolongewebe nur bedingt angeschaltet wurden.

Insgesamt wurden 46 % der identifizierten Proteine mit einem veränderten Redoxstatus nach den Se-Supplementierungen als Zytoskelettbestandteile klassifiziert (Abbildung 4-11). Das Zytoskelett stellt ein redox-reguliertes Netzwerk dar [244–246] wobei die redox-vermittelten Veränderungen nicht nur eine Rolle in der Regulation der Aktindynamik sondern auch in der Kontrolle Aktin-regulierender Proteine sowie verschiedener Signalkomponenten haben [246,247]. Zusätzlich sind im Zytoskelett im besonderen hoch-reduzierte Cys-Reste funktionell assoziiert [248]. Im Se-Mangel lagen die meisten der identifizierten Proteine des Zytoskeletts in einem mehr oxidierten Redoxstatus vor als in den Se-supplementierten Gruppen. Dies könnte bedeuten, dass es unter Se-Mangel-Konditionen im murinen Kolongewebe zu einer strukturellen oder auch funktionellen Veränderung des Zytoskelettes kommt, welches nachfolgend zu Störungen assoziierter Signalwege und einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Erkrankungen führen kann [245]. Jedoch führte insbesondere die Supplementierung der organischen Se-Verbindung SeMet nach 20 Wochen in den murinen Kolongeweben zu einem signifikant verringerten

reduzierten Proteinstatus von *Tubulin beta-4b chain* (TBB4B), *Tropomyosin alpha-3 chain* (TPM3) oder auch LMNA im Vergleich zur Se-Mangel Gruppe (Tabelle 4-4).

LMNA ist das einzige Protein der vorliegenden Arbeit, was in allen drei 2D-DIGE-Experimenten als signifikant verändert identifiziert wurde und demnach zum einen Se als auch GPx2 abhängig exprimiert wird und zum anderen durch Se redox-modifiziert wird. Während die Supplementierungen mit Selenit (ad, ho) und Selenat (ho) den reduzierten Proteinstatus von LMNA signifikant im Vergleich zum Se-Mangel erhöhten, vermutlich bedingt durch die gleichzeitige Hochregulation der LMNA Proteinmenge durch Se (Tabelle 4-1), führten beide SeMet-Supplementierungen zu einer Verringerung des reduzierten LMNA-Redoxstatus im Vergleich zum Se-Mangel.

LMNA enthält in seiner AS-Sequenz insgesamt 5 Cys-Reste, zu deren oxPTMs jedoch bisher kaum etwas beschrieben wurde. Während der Prozesszierung vom Vorläuferprotein Prelamin A/C zum Lamin A/C ist die Farnesylierung und Methylierung von Cys^{662} wichtig für das Abspalten von insgesamt 18 AS und der nachfolgenden Lokalisation an der inneren Kernmembran [249–251]. Ob eine SeMet Supplementation in diesem Prozess eingreift oder bisher unbekannte oxPTMs an LMNA im Vergleich zum Se-Mangel verursacht, könnte in nachfolgenden Experimenten näher betrachtet werden. Der bekannte nicht-regulierte und unspezifische Einbau von SeMet anstatt von Met in die AS-Sequenz von Proteinen [23] spielt hierbei eine mögliche Rolle. Dessen Umfang könnte als Sensor für einen SeMet- bzw. Se-Überschuss dienen sowie zu zellulären Fehlfunktionen bzw. Toxizität führen [252]. LMNA ist im Zellkern lokalisiert. Mittels einer Zellkulturstudie mit humanen Lungenkrebszellen (A549) konnte eine Akkumulation von SeMet aber nicht von Sec am Rande des Zellkerns aufgezeigt werden [253]. Da die Region einer zellulären Se-Akkumulation bisher nicht bekannt ist, weist diese sichtbare Kompartimentierung auf eine mögliche spezifische biologische Aktivität von SeMet hin [253].

Zusätzlich kann SeMet über die γ-Lyase zu dem pro-oxidativ wirkenden Metabolit Methylselenol umgewandelt werden [24,254], sodass die Kombination der zellkernnahen Akkumulation und der Bildung von Methylselenol zu dem stark verringerten reduzierten Proteinstatus von LMNA durch SeMet-Supplementierung im Vergleich zum Se-Mangel und den Selenit- bzw. Selenat-Supplementierungen im murinen Kolongewebe geführt haben könnte.

5.2.1.1 Der Redoxstatus von Peroxiredoxin-6

Neben LMNA wurde der Proteinstatus von Peroxiredoxin-6 (PRDX6) ebenfalls durch SeMet-Supplementierungen beeinflusst. Dabei zeigte sich in den Redox-DIGE-

Experimenten ein signifikant verringerter reduzierter PRDX6-Proteinstatus nach ho-SeMet-Supplementation im Vergleich zum Se-Mangel sowie zur ad-SeMet supplementierten Gruppe (Tabelle 4-4). Da PRDX6 auch in einer bereits publizierten Redox-DIGE Analyse in einer humanen Haut-Fibroblasten-Zelllinie (CCD-966SK) nach UVB-Strahlung als redox-moduliert identifiziert wurde [255] und es in dem Kontext der vorliegenden Arbeit ein interessantes Protein darstellt, wurde PRDX6 für eine Validierung ausgewählt. Mittels einer Variante des Redox-Blot konnte nachfolgend der Unterschied zwischen den SeMet-supplementierten Gruppen tendenziell bestätigt werden (Abbildung 4-13).

PRDX6 gehört zu der Gruppe der PRDX, welche insgesamt bis zu einem Prozent der totalen löslichen zellulären Proteinmenge ausmachen können, H_2O_2 detoxifizieren und somit einen wichtigen Anteil an der zellulären Redox-Homöostase haben [91]. PRDX6 ist das einzige PRDX mit einem konservierten Cys (1-Cys PRDX, Cys^{47}) und hat zusätzlich zur Peroxidase- auch eine Calcium-unabhängige Phospholipase A2-Funktion [256]. Im Gegensatz zu anderen PRDX bildet PRDX6 keine Homodimere über Disulfidbrücken sondern wie *in vitro*-Studien aufzeigten, vielmehr über Wasserstoffbrücken oder andere intermolekulare Interaktionen zwischen den Monomeren [257,258].

Der in der vorliegenden Arbeit angewendete Validierungsansatz lässt vermuten, dass es durch eine SeMet-Supplementierung im murinen Kolongewebe zu einem veränderten Interaktom von PRDX6 kommen könnte (Abbildung 4-13). Ohne die Zugabe von β-ME bei der SDS-PAGE blieben die Disulfidbrücken zwischen PRDX6 und seinen Interaktions-partnern bestehen. Da PRDX6 kein zweites konserviertes Cys hat, kann eine Sulfensäure am Cys^{47} nur über die Interaktion mit einem externen Reduktanten, im Fall von PRDX6 meist GSH [257,259] oder Ascorbat [260], aufgelöst werden [261]. Im humanen System sind bereits Interaktionspartner von PRDX6 beschrieben. Beispielsweise reagiert das zur Sulfensäure oxidierte Cys^{47} mit GSH, welches von der GSTpi1 katalysiert wird. Hierbei hetero-dimerisiert PRDX6 mit einer GSH-beladenen GSTpi1 und wird nachfolgend glutathionyliert [262,263]. Eine Interaktion bzw. Komplexbildung über eine Disulfidbrücke zwischen diesen beiden Proteine wurde bereits beschrieben [263], sodass eine der sichtbaren Banden des Redox-Blotes vom murinen Kolongewebe diese Interaktion widerspiegeln könnte. Jedoch wird auch postuliert, dass die PDX6-GSTpi1 Interaktion ähnlich wie die PRDX6-Dimerbildung nicht über eine Disulfidbrücke stattfindet, da bei Betrachtung der kinetischen Bedingungen die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen PRDX6 und GSTpi1 kaum als Teil des normalen Reaktionszyklus zu sehen ist [261]. Eine ho-SeMet-Supplementierung führte im murinen Kolongewebe zu einem verringerten reduzierten PRDX6-Proteinstatus, sodass auch ein Einfluss des pro-oxidativ wirkenden SeMet-Metabolites Methylselenol vorliegen kann [24,254].

5.2.2 Optimierung der Redox-DIGE Methode und weitere Methoden zur Detektion von oxPTMs

Studien mit Anwendung der Redox-DIGE-Methode sind in der wissenschaftlichen Literatur im Vergleich zu 2D-DIGE Ansätzen bisher weniger publiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Analyse des Redox-Proteoms des murinen Kolongewebes ein neuer Redox-DIGE-Ansatz entwickelt und angewendet. Die gewählte Markierungsstrategie war dabei ähnlich der kürzlich von Poschmann *et al.* veröffentlichten [172], allerdings wurde ein Schritt der Blockierung freier Cys-Reste mit einem CinC^{TM}-Molekül, was eine ähnliche Masse sowie eine gleiche Ladung wie die Fluoreszenzfarbstoffe aufweist, hinzugefügt. Dies unterbindet Thiolmodifizierungen während der nachfolgenden 2D-Trennung. Es ist weiter bekannt, dass insbesondere oxidierte Proteine anfällig für Thiol-Disulfid-Austausch-reaktionen mit Cys-Resten anderer Proteine oder mit niedermolekularen Thiolen sind. Somit wäre es sinnvoll während der Gewebelyse ein alkylierendes Molekül wie NEM hinzuzufügen [171,264]. Jedoch führte diese Alkylierung mit NEM in der Entwicklungsphase des verwendeten Redox-DIGE-Ansatzes zu Problemen, da die verwendeten Fluoreszenz-farbstoffe nicht nur eine größere Masse haben, sondern zusätzlich eine Ladung im Vergleich zum NEM tragen. Dadurch kam es zu einem nicht auswertbaren verschobenen Spotmuster. Eine Lösungsvariante für dieses Problem und somit eine zukünftige Weiterentwicklung der in dieser Arbeit genutzten Redox-DIGE-Markierungs-strategie wäre während der Gewebelyse den Farbstoff [255] bzw. das CinC^{TM}-Molekül hinzuzufügen um Thiolmodifizierungen die nach der Lyse entstehen können zu limitieren.

Gründe für die wenigen Veröffentlichungen mit Verwendung der Redox-DIGE-Methode könnten die angesprochenen Probleme sein, allerdings haben die technischen Weiter-entwicklungen von Massenspektrometern im letzten Jahrzehnt die proteomische und redox-proteomische [248] Forschung vorangebracht. So kam es neben den gel-basierenden Methoden zur Entwicklung verschiedener MS-basierter Methoden von denen eine Auswahl in Tabelle 5-2 mit entsprechenden Vor- und Nachteilen aufgeführt ist.

Ein großer Nachteil der Redox-DIGE Methode ist, dass die spezifischen modifizierten Cys-Reste sowie die entsprechende oxPTM eines Proteins nicht identifiziert werden können [265]. Diese modifizierten Cys-Reste können mittels MS genau bestimmt werden. Zusätzlich können insbesondere im CysTMT- bzw. IodoTMT-Ansatz Hochdurchsatz-analysen mit bis zu sechs isobaren Tags durchgeführt werden.

Mit Anwendung der IodoTMT wurde kürzlich eine Studie veröffentlich, in der die Änderungen des Redoxoms nach Fasten und nach einer Hochfett-Diät in Lebern von Mäusen verglichen wurden. Hierbei konnten insgesamt 846 redox-modifizierte Cys-Reste in 403 Proteinen quantifiziert werden, von denen sich die Autoren zukünftig ein besseres

Tabelle 5-2: Methoden zur Detektion von oxPTMs.

Methode	Detektion von	Vorteile	Nachteile	Ref.
		Gel-basierend		
Diagonale 2D-SDS PAGE	Inter-/ intramolekulare DB	Geringer Materialaufwand; Reduzierende/ nicht-reduzierende GE	Geringer Durchsatz; anfällig für artifizielle Produkte während Durchführung	[266,267]
Immunoblotting nach 2DE	z.B. SO^-, SO_2^-, SO_3^-, GSH durch Nutzung spezifischer AK	Spezielle AK gegen oxPTMs an Proteinen verfügbar (z.B. PRDX)	Spezifische Antikörper benötigt	[268–270]
2D-Redox DIGE	abh. vom Reduktionsmittel (RM): TCEP/DTT → reversibel ox. Cys Cu (II)/ Ascorbat → S-Nitrosothiol Arsenit → SO^-	Momentaufnahme des Redox-Proteoms; Identifizierung neuer Redox-Sensoren Möglichkeit spezifisch Signale von Isoformen zu quantifizieren	zeit-aufwändig; Unterrepräsentation wenig abundanter/hydrophober Proteine und von Membranproteinen	[171,271–273]
→ ***Nachteil*** aller Gel-basierten Ansätze: keine genaue Identifizierung der redox-modifizierten Cys				
		MS-basierend		
OxICAT	abh. vom RM; reversibel ox. Cys	MS/MS-Level; Hochdurchsatzanalysen	2 Proben vergleichbar (leichte ^{12}/ schwere ^{13}C-Form des Tag)	[274,275]
CysTMT	abh. vom RM; reversibel ox. Cys	MS/MS-Level; Hochdurchsatzanalysen; viele isobarische Tags (*six-plex* Analyse); anti-TMT Aufreinigung	Reduktion DB zwischen Thiol und Tag durch stark red. Bedingungen	[276,277]
IodoTMT	abh. vom RM; reversibel ox. Cys	MS/MS-Level; Hochdurchsatzanalysen; viele isobarische Tags (*six-plex* Analyse); anti-TMT Aufreinigung; irreversible Thiol-Tag Bindung		[278]
OxMRM	Reversibel ox. Cys an einem speziellen Zielprotein	Quantifizierung des Redoxstatus von wenig abundanten Proteinen; MS/MS-Level	Spezifische Antikörper benötigt	[279]
→ ***Vorteil*** aller MS-basierten Ansätze: Identifizierung der redox-modifizierten Cys				
→ ***Nachteil*** aller MS-basierten Ansätze: hohe Anschaffungskosten für Geräte und Tags sowie große Datenmengen				

ox. Cys; oxidierte Cystein-Reste; oxPTM, oxidative post-translationale Modifikation; PRDX, Peroxiredoxin; RM, Reduktionsmittel; SO^-, Sulfensäure; SO_2^-, Sulfinsäure; SO_3^-, Sulfonsäure.

Verständnis des Lebermetabolismus unter den genannten Konditionen versprechen [280]. In einem von Fu *et al.* durchgeführten Vergleich der Redox-DIGE Methode und der OxICAT wurde an einem Modellsystem, indem Herzproteine der Maus mit H_2O_2 behandelt wurden, durchgeführt. Hierbei konnten mittels OxICAT 50 redox-modifizierte und mittels Redox-DIGE 26 redox-modifizierte Proteine detektiert werden, wobei insgesamt 13 Proteine mit beiden Methoden als redox-modifiziert gefunden wurden [273]. Dies zeigt auf, dass sich eine Kombination verschiedener Methoden zur Detektion von oxPTMs sinnvoll ergänzt, um ein erweitertes Bild und somit Verständnis des Redox-Signalings zu erlangen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die präventiven Effekte des Spurenelementes Selen (Se) bezüglich der menschlichen Gesundheit aber auch bei Erkrankungen werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Physiologische Funktionen übt Se zum einen über Selenoproteine aus, in deren aktiven Zentrum es als Bestandteil der Aminosäure Selenocystein lokalisiert ist, und zum anderen kommt Se in verschiedenen chemischen Formen vor, welche mit unterschiedlichen Bioverfügbarkeiten einhergehen.

Um das Verständnis der Funktionen von Se zu erweitern, wurden in der vorliegenden Arbeit die Effekte von Supplementierungen mit den Se-Verbindungen Selenit, Selenat und Selenomethionin (SeMet) in zwei Konzentrationen (adäquat, ad, 150 µg Se/kg Diät; hoch, ho; 750 µg Se/ kg Diät) vergleichend zu einem Se-Mangel auf das murine Kolonproteom untersucht. Unter Anwendung der 2D-DIGE, gekoppelt mit MALDI-TOF-MS konnten nach einem 20-wöchiger Fütterungsversuch mit C57BL/6j-Mäusen insgesamt 23 Proteine, deren Mengen signifikant durch die Se-Supplementierungen im Vergleich zum Se-Mangel reguliert wurden, im Kolongewebe identifiziert werden. Von diesen wurden 46 % hinsichtlich ihrer molekularen Funktion in die *Gene Ontology* (GO)-Gruppe Ligandbindung/-interaktion klassifiziert. Nachfolgende Validierungen mittels qPCR und Western Blot bestätigen die Regulationsmuster der Se-regulierten Proteine im murinen Kolongewebe. Hierbei stellen insbesondere LMNA, COF1 und ABHD14B Proteine dar, welche durch Se-Supplementierungen signifikant im Vergleich zum Se-Mangel hochreguliert wurden.

Nachfolgend wurden Zellkulturexperimente mit Se-Behandlungen der Kolonkarzinom-Zelllinien HT-29, HCT116 und Colo320 als weiterer Validierungsansatz durchgeführt, um eine mögliche Übertagbarkeit der Ergebnisse im murinen Gewebe auf das humane Modell zu überprüfen. Die Ergebnisse der 2D-DIGE-Experimente mit murinem Kolongewebe konnten nicht in humanen Kolonkarzinom-Zelllinien bestätigt werden. Jedoch konnte eine heterogene mRNA- als auch Protein-Menge der Zielproteine ABHD14B, LMNA, ANXA2, COF1 als auch der GPx2 innerhalb der drei Zelllinien detektiert werden, wobei HT-29-Zellen diese Zielstrukturen signifikant erhöht im Vergleich zu HCT116- oder Colo320-Zellen exprimierten.

Viele der Selenoproteine sind Oxidoreduktasen und nehmen dadurch eine Rolle in der Aufrechterhaltung der zellulären Redox-Homöostase ein. Se-Verbindungen können ebenfalls unterschiedliche Einflüsse auf das zelluläre oxidative Milieu sowie auf redox-Modifikationen an Proteinen haben. Zur Analyse der Veränderungen des Redox-Proteoms im murinen Kolongewebe der C57BL/6j-Mäuse nach ad- und ho-Supplementierungen mit Selenit, Selenat und SeMet im Vergleich zum Se-Mangel wurde eine Redox-DIGE Methode entwickelt. Insgesamt 17 signifikant durch Se redox-modifizierte Proteine konnten

anschließend mittels MALDI-TOF-MS identifiziert werden. Von diesen wurden 46 % als Bestandteile des Zytoskelettes klassifiziert. Die meisten Proteine zeigten einen erhöhten reduzierten Redoxstatus, nach Se-Supplementierung im Vergleich zum Se-Mangel, auf. Dies bestätigt die Annahme, dass ein Se-Mangel mit einem erhöhten oxidativen Stress einhergehen könnte. In Validierungsversuchen des Redoxstatus von PRDX6 mittels Redox-Blot konnten die Ergebnisse der Redox-DIGE im murinen Kolongewebe tendenziell bestätigt werden. Eine ho-SeMet-Supplementierung führte zu einem verringerten reduzierten Proteinstatus im Vergleich zur ad-SeMet- als auch zur Se-Mangel-Gruppe.

Das Selenoprotein GPx2 wird vorranging im Gastrointestinaltrakt (GIT) exprimiert und wurde u.a. mit der Zellproliferation in Verbindung gebracht. Um mögliche zusätzliche Funktionen der GPx2 im murinen Kolongewebe zu finden, wurde ein weiterer Fütterungsversuch mit GPx2 *knockout* (KO)-Mäusen und entsprechenden Wildtyp (WT)-Mäusen durchgeführt. Zusätzlich wurde der Einfluss einer ad-Selenit-Supplementierung im Vergleich zum Se-Mangel untersucht. Mittels 2D-DIGE und MALDI-TOF-MS konnten 21 Proteine, deren Mengen signifikant durch den GPx2 KO und/oder die Selenit-Supplementierung reguliert wurden, identifiziert werden. Die meisten dieser Proteine konnten, wie schon im 20-wöchigen C57BL/6j-Versuch der funktionellen Gruppe der Proteine mit Ligandbindung/-interaktion zugeordnet werden. Die Proteinmengen von HSP84, LMNA als auch CLCA1 wurden sowohl durch die Selenit-Supplementierung als auch den GPx2 KO beeinflusst. So erhöhte die Selenit-Supplementierung die Mengen der genannten Proteine im murinen Kolongewebe im Vergleich zur Se-Mangelkondition, während der GPx2 KO die Proteinmengen im Vergleich zum WT verringerte.

7 AUSBLICK

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können als Basis verschiedener weiterführender Experimente dienen. Es zeigte sich ein heterogener Einfluss der vervendeten Se-Verbindungen Selenit, Selenat und SeMet auf das Proteom als auch auf das Redox-Proteom des murinen Kolongewebes.

Manche der signifikant Se-regulierten Proteine werden mit der Zellproliferation (ANXA2, GRB2) oder dem Calcium-Metabolismus (ANXA2, CLCA1, CSS1) in Verbindung gebracht. Zukünftig könnten hinsichtlich der Zellproliferation intestinale Stammzellmarker wie der *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5* (LGR5) oder auch Bestandteile des WNT-Signalweges nach Supplementierung mit den drei Se-Verbindungen untersucht werden. In Bezug auf den Calcium-Metabolismus könnten der Einfluss der Se-Verbindungen auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration als auch auf die Expression verschiedener Calcium-Pumpen, wie beispielsweise *Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2* (SERCA2) oder den *Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type* (ITPR) Isoformen sowie der Zusammenhang des Calcium-Metabolismus mit apoptotischen Prozessen [281] betrachtet werden. In diesem Zusammenhang ist bereits bekannt, dass verschiedene Selenoproteine wie z.B. SELENON oder SELONOK, im ER lokalisiert und am Calcium-Fluss bzw. an der Calcium-Homöostase beteiligt sind [282]. Wie diese Mechanismen im Kolongewebe durch verschiedene Se-Verbindungen reguliert werden könnten, ist bisher kaum erforscht und wäre ebenfalls ein interessanter Ansatz für weiterführende Untersuchungen.

Die Ergebnisse der DIGE-Analysen des murinen Kolongewebes konnten nicht in nachfolgenden Zellkulturexperimenten mit humanen Kolonkarzinom-Zelllinien bestätigt werden, zum Teil kam es zu gegenteiligen Effekten der Se-Behandlungen. Zukünftig könnte ein *in vivo*-Experiment mit einem Tumormodell des Kolorekatalen-Karzinoms, indem neben dem Effekt einer Se-Supplementierung auf die Tumorentstehung und –größe sowie dessen Proteom auch der Einfluss der Se-Verbindungen auf einen nicht maligne veränderten Kolongewebeteil untersucht wird, durchgeführt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Einfluss der Se-Verbindungen auf den Redoxstatus von Proteinen des murinen Kolongewebes aufgezeigt werden. Im Falle des redox-modifizierten Proteins PRDX6 könnten in nachfolgenden Analysen die Interaktionspartner mittels Co-Immunopräzipitation (CoIP) identifiziert und eventuelle Unterschiede hinsichtlich dieser Interaktionspartner durch die Se-Verbindungen gefunden werden.

In den nächsten Jahren werden sich die experimentellen Ansätze zur Erforschung von oxPTMs an Proteinen weiterentwickeln, da das Wissen über Redox-Signalwege nach wie

vor limitiert ist. So könnten sich durch ein erweitertes Verständnis der Redox-Signaltransduktion mögliche Therapieansätze für Erkrankungen wie Krebs ergeben [91]. Acedo *et al.* (2018; preprint) zeigten kürzlich unter Anwendung von zwei Medikamenten (Protoporphyrin iX (PpIX); Verteporfin®), die in der photodynamischen Therapie (PDT) von Pankreaskrebspatienten eingesetzt werden, eine erhöhte Apoptose von pankreatischen Krebszellen. Zusätzlich führte die Behandlung zu einer Akkumulation von ROS, wodurch es zu einer Inhibierung das Selenoproteins TXNRD1 kam. Die Autoren schlussfolgerten, dass Moleküle, welche über zwei unterschiedliche Wege den Krebszelltod induzieren, vielversprechende Kandidaten zur Verbesserung einer Krebstherapie sein könnten [283].

In der vorliegenden Arbeit konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass Se sowohl das Proteom als auch das Redox-Proteom im murinen Kolongewebe beeinflusst. Ob die Kombination dieser Effekte von Se ebenfalls einen Vorteil in der Prävention oder Behandlung von intestinalen Erkrankungen hat, sollte in zukünftigen Untersuchungen näher betrachtet werden.

8 LITERATURVERZEICHNIS

[1] Reich, H.J., Hondal, R.J., Why Nature Chose Selenium. *ACS Chem. Biol.* 2016, 11, 821–841.

[2] Madison, T.C., Sanitary report – Fort Randall. In Statistical Report on the Sickness and Mortality in the Army of the United States. *36th Congr. Senat. Exch. Doc.* 1860, 37–41.

[3] Painter, E.P., The Chemistry and Toxicity of Selenium Compounds, with Special Reference to the Selenium Problem. *Chem. Rev.* 1941, 28, 179–213.

[4] Patterson, E.L., Milstrey, R., Stokstad, E.L., Effect of selenium in preventing exudative diathesis in chicks. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1957, 95, 617–625.

[5] Schwarz, K., Bieri, J.G., Briggs, G.M., Scott, M.L., Prevention of Exudative Diathesis in Chicks by Factor 3 and Selenium. *Exp. Biol. Med.* 1957, 95, 621–625.

[6] Schwarz, K., Foltz, C.M., Selenium as an Integral Part of Factor 3 Against Dietary Necrotic Liver Degeneration. *J. Am. Chem. Soc.* 1957, 79, 3292–3293.

[7] Li, G., Wang, F., Kang, D., Li, C., Keshan disease: An endemic cardiomyopathy in China. *Hum. Pathol.* 1985, 16, 602–609.

[8] Chen, J., An original discovery: selenium deficiency and Keshan disease (an endemic heart disease). *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2012, 21, 320–326.

[9] Johnson, C.C., Fordyce, F.M., Rayman, M.P., Symposium on “Geographical and geological influences on nutrition”: Factors controlling the distribution of selenium in the environment and their impact on health and nutrition. *Proc. Nutr. Soc.* 2010, 69, 119–132.

[10] Kipp, A.P., Strohm, D., Brigelius-Flohé, R., Schomburg, L., et al., Revised reference values for selenium intake. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2015, 32, 195–199.

[11] Jukes, T.H., Selenium, an “essential poison”. *J. Appl. Biochem.* 1983, 5, 233–234.

[12] Huawei, Z., Selenium as an essential micronutrient: Roles in cell cycle and apoptosis. *Molecules* 2009, 14, 1263–1278.

[13] Roman, M., Jitaru, P., Barbante, C., Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics* 2014, 6, 25–54.

[14] Wolffram, S., Ardüser, F., Scharrer, E., In vivo intestinal absorption of selenate and selenite by rats. *J. Nutr.* 1985, 115, 454–459.

[15] Turner, J.C., Osborn, P.J., Mcveagh, S.M., Studies on selenate and selenite absorption by sheep ileum using an everted SAC method and an isolated, vascularly perfused system. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol.* 1990, 95, 297–301.

[16] Burk, R.F., Hill, K.E., Regulation of Selenium Metabolism and Transport. *Annu. Rev. Nutr.* 2015, 35, 109–134.

[17] Combs, G.F., Jr., Biomarkers of selenium status. *Nutrients* 2015, 7, 2209–2236.

[18] McConnell, K.P., Cho, G.J., Transmucosal movement of Selenium. *Am. J. Physiol.* 1965, 208, 1191–1195.

[19] Takahashi, K., Suzuki, N., Ogra, Y., Bioavailability comparison of nine bioselenocompounds in vitro and in vivo. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 506.

[20] Zeng, H., Jackson, M.I., Cheng, W.-H., Combs, G.F.J., Chemical Form of Selenium Affects Its Uptake , Transport , and Glutathione Peroxidase Activity in the Human Intestinal Caco-2 Cell Model. *Biol. Trace Elem. Res.* 2011, 143, 1209–1218.

[21] Thomson, C.D., Robinson, M.F., Butler, J.A., Whanger, P.D., Long-term supplementation with selenate and selenomethionine: Selenium and glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) in blood components of New Zealand women. *Br. J. Nutr.* 1993, 69, 577–588.

[22] Bogye, G., Alfthan, G., Machay, T., Bioavailability of enteral yeast-selenium in preterm infants. *Biol. Trace Elem. Res.* 1998, 65, 143–151.

[23] Combs, G.F., Jackson, M.I., Watts, J.C., Johnson, L.K., et al., Differential responses to selenomethionine supplementation by sex and genotype in healthy adults. *Br. J. Nutr.* 2012,

107, 1514–1525.

[24] Suzuki, K.T., Doi, C., Suzuki, N., Metabolism of 76Se-methylselenocysteine compared with that of 77Se-selenomethionine and 82Se-selenite. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006, 217, 185–195.

[25] Kobayashi, Y., Ogra, Y., Suzuki, K.T., Speciation and metabolism of selenium injected with 82Se-enriched selenite and selenate in rats. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 2001, 760, 73–81.

[26] Schrauzer, G.N., Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *J. Nutr.* 2000, 130, 1653–1656.

[27] Esaki, N., Nakamura, T., Tanaka, H., Soda, K., Selenocysteine lyase, a novel enzyme that specifically acts on selenocysteine. Mammalian distribution and purification and properties of pig liver enzyme. *J. Biol. Chem.* 1982, 257, 4386–4391.

[28] Burk, R.F., Hill, K.E., Selenoprotein P – Expression, Functions, and Roles in Mammals. *Biochim. Biophys. Acta* 2009, 1790, 1441–1447.

[29] Labunskyy, V.M., Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N., Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiol. Rev.* 2014, 94, 739–777.

[30] Copeland, P.R., Fletcher, J.E., Carlson, B.A., Hatfield, D.L., Driscoll, D.M., A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. *EMBO J.* 2000, 19, 306–314.

[31] Fagegaltier, D., Hubert, N., Yamada, K., Mizutani, T., et al., Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. *EMBO J.* 2000, 19, 4796–4805.

[32] Gonzalez-Flores, J.N., Gupta, N., DeMong, L.W., Copeland, P.R., The selenocysteine-specific elongation factor contains a novel and multi-functional domain. *J. Biol. Chem.* 2012, 287, 38936–38945.

[33] Chavatte, L., Brown, B.A., Driscoll, D.M., Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005, 12, 408–416.

[34] Budiman, M.E., Bubenik, J.L., Miniard, A.C., Middleton, L.M., et al., Eukaryotic Initiation Factor 4a3 Is a Selenium-Regulated RNA-Binding Protein that Selectively Inhibits Selenocysteine Incorporation. *Mol. Cell* 2009, 35, 479–489.

[35] Miniard, A.C., Middleton, L.M., Budiman, M.E., Gerber, C.A., Driscoll, D.M., Nucleolin binds to a subset of selenoprotein mRNAs and regulates their expression. *Nucleic Acids Res.* 2010, 38, 4807–4820.

[36] Burk, R.F., Hill, K.E., Motley, A.K., Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P. *J. Nutr.* 2003, 133, 1517S–1520S.

[37] Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V, Lobanov, A. V, et al., Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 2003, 300, 1439–1443.

[38] Reeves, M.A., Hoffmann, P.R., The human selenoproteome: Recent insights into functions and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009, 66, 2457–2478.

[39] Flohé, L., Günzler, W.A., Schock, H.H., Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 1973, 32, 132–134.

[40] Brigelius-flohé, R., Maiorino, M., Glutathione peroxidases. *BBA - Gen. Subj.* 2013, 1830, 3289–3303.

[41] Kasaikina, M. V., Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N., Understanding selenoprotein function and regulation through the use of rodent models. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2012, 1823, 1633–1642.

[42] Wrobel, J.K., Power, R., Toborek, M., Biological activity of selenium: Revisited. *IUBMB Life* 2016, 68, 97–105.

[43] Chen, X., Che, C., Korolchuk, V.I., Gan, F., et al., Selenomethionine Alleviates AFB1-Induced Damage in Primary Chicken Hepatocytes by Inhibiting CYP450 1A5 Expression via

Upregulated SelW Expression. *J. Agric. Food Chem.* 2017, 65, 2495–2502.

[44] Regina, B.F., Gladyshev, V.N., Arnér, E.S., Berry, M.J., et al., Selenoprotein gene nomenclature. *J. Biol. Chem.* 2016, 291, 24036–24040.

[45] Lei, X.G., Evenson, J.K., Thompson, K.M., Sunde, R.A., Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium. *J. Nutr.* 1995, 125, 1438–1446.

[46] Wingler, K., Böcher, M., Flohé, L., Kollmus, H., Brigelius-Flohé, R., mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins. *Eur. J. Biochem.* 1999, 259, 149–157.

[47] Faller, A., Schünke, M., *Der Körper des Menschen : Einführung in Bau und Funktion*, 2004.

[48] Nguyen, T.L.A., Vieira-Silva, S., Liston, A., Raes, J., How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis. Model. Mech.* 2015, 8, 1–16.

[49] Hugenholtz, F., de Vos, W.M., Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. *Cell. Mol. Life Sci.* 2018, 75, 149–160.

[50] Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., et al., *PROMETHEUS LernAtlas der Anatomie: Innere Organe*, 2015.

[51] Pérez, S., Taléns-Visconti, R., Rius-Pérez, S., Finamor, I., Sastre, J., Redox signaling in the gastrointestinal tract. *Free Radic. Biol. Med.* 2017, 104, 75–103.

[52] Florian, S., Wingler, K., Schmehl, K., Jacobasch, G., et al., Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue. *Free Radic. Res.* 2001, 35, 655–663.

[53] Koboziev, I., Karlsson, F., Grisham, M.B., Gut-associated lymphoid tissue, T cell trafficking, and chronic intestinal inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2010, 1207, E86-93.

[54] van der Flier, L.G., Clevers, H., Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 2009, 71, 241–260.

[55] De Santa Barbara, P., Van Den Brink, G.R., Roberts, D.J., Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003, 60, 1322–1332.

[56] Chu, F.F., Doroshow, J.H., Esworthy, R.S., Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* 1993, 268, 2571–2576.

[57] Banning, A., Deubel, S., Kluth, D., Zhou, Z., Brigelius-Flohé, R., The GI-GPx gene is a target for Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* 2005, 25, 4914–4923.

[58] Florian, S., Krehl, S., Loewinger, M., Kipp, A., et al., Loss of GPx2 increases apoptosis, mitosis, and GPx1 expression in the intestine of mice. *Free Radic. Biol. Med.* 2010, 49, 1694–1702.

[59] Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., Clevers, H., Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev.* 2003, 17, 1709–1713.

[60] Kipp, A., Banning, A., Brigelius-Flohé, R., Activation of the glutathione peroxidase 2 (GPx2) promoter by β-catenin. *Biol. Chem.* 2007, 388, 1027–1033.

[61] Kipp, A.P., Müller, M.F., Göken, E.M., Deubel, S., Brigelius-Flohé, R., The selenoproteins GPx2, TrxR2 and TrxR3 are regulated by Wnt signalling in the intestinal epithelium. *Biochim. Biophys. Acta* 2012, 1820, 1588–96.

[62] Bedard, K., Krause, K.-H., The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* 2007, 87, 245–313.

[63] Schieber, M., Chandel, N.S., ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* 2014, 24, R453-462.

[64] Brookes, P.S., Mitochondrial H+ leak and ROS generation: An odd couple. *Free Radic. Biol. Med.* 2005, 38, 12–23.

[65] Lushchak, V.I., Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification.

Chem. Biol. Interact. 2014, 224, 164–175.

[66] Finkel, T., Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.* 2011, 194, 7–15.

[67] Kurutas, E.B., The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr. J.* 2016, 15, doi:10.1186/s12937-016-0186-5.

[68] Finkel, T., Oxidant signals and oxidative stress. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003, 15, 247–254.

[69] Rayman, M.P., Selenium and human health. *Lancet (London, England)* 2012, 379, 1256–1268.

[70] Reczek, C.R., Chandel, N.S., ROS-dependent signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2015, 33, 8–13.

[71] Belcastro, E., Gaucher, C., Corti, A., Leroy, P., et al., Regulation of protein function by S-nitrosation and S-glutathionylation: Processes and targets in cardiovascular pathophysiology. *Biol. Chem.* 2017, 398, 1267–1293.

[72] Janssen-Heininger, Y.M.W., Mossman, B.T., Heintz, N.H., Forman, H.J., et al., Redox-based regulation of signal transduction: Principles, pitfalls, and promises. *Free Radic. Biol. Med.* 2008, 45, 1–17.

[73] Huber, R.E., Criddle, R.S., Comparison of the chemical properties of selenocysteine and selenocystine with their sulfur analogs. *Arch. Biochem. Biophys.* 1967, 122, 164–173.

[74] Nauser, T., Steinmann, D., Koppenol, W.H., in:, *Amino Acids*, vol. 42, 2012, pp. 39–44.

[75] Reich, H.J., Hondal, R.J., Why Nature Chose Selenium. *ACS Chem. Biol.* 2016, 11, 821–841.

[76] Hondal, R.J., Ruggles, E.L., Differing views of the role of selenium in thioredoxin reductase. *Amino Acids* 2011, 41, 73–89.

[77] Trachootham, D., Alexandre, J., Huang, P., Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2009, 8, 579–591.

[78] Andersen, J.K., Oxidative stress in neurodegeneration: Cause or consequence? *Nat. Rev. Neurosci.* 2004, 10, S18-25.

[79] Kumar, M., Matta, A., Masui, O., Srivastava, G., et al., Nuclear heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D is associated with poor prognosis and interactome analysis reveals its novel binding partners in oral cancer. *J. Transl. Med.* 2015, 13, doi:10.1186/s12967-015-0637-3.

[80] Haigis, M.C., Yankner, B.A., The Aging Stress Response. *Mol. Cell* 2010, 40, 333–344.

[81] Chung, H.S., Wang, S.B., Venkatraman, V., Murray, C.I., Van Eyk, J.E., Cysteine oxidative posttranslational modifications: Emerging regulation in the cardiovascular system. *Circ. Res.* 2013, 112, 382–392.

[82] Marino, S.M., Gladyshev, V.N., Analysis and Functional Prediction of Reactive Cysteine Residues. *J. Biol. Chem.* 2012, 287, 4419–4425.

[83] Biteau, B., Labarre, J., Toledano, M.B., ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by S. cerevisiae sulphiredoxin. *Nature* 2003, 425, 980–984.

[84] Hyun, A.W., Jeong, W., Chang, T.S., Kwang, J.P., et al., Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-Cys peroxiredoxins. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 3125–3128.

[85] Lowther, W.T., Haynes, A.C., Reduction of Cysteine Sulfinic Acid in Eukaryotic, Typical 2-Cys Peroxiredoxins by Sulfiredoxin. *Antioxid. Redox Signal.* 2011, 15, 99–109.

[86] Braakman, I., Bulleid, N.J., Protein Folding and Modification in the Mammalian Endoplasmic Reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 2011, 80, 71–99.

[87] Go, Y.M., Chandler, J.D., Jones, D.P., The cysteine proteome. *Free Radic. Biol. Med.* 2015, 84, 227–245.

[88] Griendling, K.K., Touyz, R.M., Zweier, J.L., Dikalov, S., et al., Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Circ.*

Res. 2016, 119, e39–e75.

[89] Ray, P.D., Huang, B.W., Tsuji, Y., Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* 2012, 24, 981–990.

[90] Lennicke, C., Rahn, J., Lichtenfels, R., Wessjohann, L. a, Seliger, B., Hydrogen peroxide - production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Commun. Signal.* 2015, 13, 39.

[91] Hornsveld, M., Dansen, T.B., The Hallmarks of Cancer from a Redox Perspective. *Antioxid. Redox Signal.* 2016, 25, 300–325.

[92] Brimacombe, K.R., Anastasiou, D., Hong, B.S., Tempel, W., et al., ML285 affects reactive oxygen species' inhibition of pyruvate kinase M2. *Probe Reports from NIH Mol. Libr. Progr.* 2010, 50, 1–18.

[93] Anastasiou, D., Poulogiannis, G., Asara, J.M., Boxer, M.B., et al., Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science (80-.).* 2011, 334, 1278–1283.

[94] Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., Crowe, S.E., Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol. Rev.* 2014, 94, 329–54.

[95] Coant, N., Ben Mkaddem, S., Pedruzzi, E., Guichard, C., et al., NADPH Oxidase 1 Modulates WNT and NOTCH1 Signaling To Control the Fate of Proliferative Progenitor Cells in the Colon. *Mol. Cell. Biol.* 2010, 30, 2636–2650.

[96] Aviello, G., Knaus, U.G., ROS in gastrointestinal inflammation: Rescue Or Sabotage? *Br. J. Pharmacol.* 2017, 174, 1704–1718.

[97] Liu, H., Liu, X., Zhang, C., Zhu, H., et al., Redox imbalance in the development of colorectal cancer. *J. Cancer* 2017, 8, 1586–1597.

[98] Scotcher, J., Clarke, D.J., Mackay, C.L., Hupp, T., et al., Redox regulation of tumour suppressor protein p53: identification of the sites of hydrogen peroxide oxidation and glutathionylation. *Chem. Sci.* 2013, 4, 1257–1269.

[99] Shen, Y., White, E., p53-dependent apoptosis pathways. *Adv. Cancer Res.* 2001, 82, 55–84.

[100] Brigelius-Flohé, R., Flohé, L., Selenium and redox signaling. *Arch. Biochem. Biophys.* 2017, 617, 48–59.

[101] Misra, S., Boylan, M., Selvam, A., Spallholz, J.E., Björnstedt, M., Redox-active selenium compounds—from toxicity and cell death to cancer treatment. *Nutrients* 2015, 7, 3536–3556.

[102] Jackson, M.I., Combs, G.F., Selenium and anticarcinogenesis: underlying mechanisms. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2008, 11, 718–26.

[103] Letavayová, L., Vlčková, V., Brozmanová, J., Selenium: From cancer prevention to DNA damage. *Toxicology* 2006, 227, 1–14.

[104] Lazard, M., Dauplais, M., Blanquet, S., Plateau, P., Recent advances in the mechanism of selenoamino acids toxicity in eukaryotic cells. *Biomol. Concepts* 2017, 8, 93–104.

[105] Zorn, M., Ihling, C.H., Golbik, R., Sawers, R.G., Sinz, A., Selective selC-Independent Selenocysteine Incorporation into Formate Dehydrogenases. *PLoS One* 2013, 8, e61913.

[106] Bierla, K., Bianga, J., Ouerdane, L., Szpunar, J., et al., A comparative study of the Se/S substitution in methionine and cysteine in Se-enriched yeast using an inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS)-assisted proteomics approach. *J. Proteomics* 2013, 87, 26–39.

[107] Plateau, P., Saveanu, C., Lestini, R., Dauplais, M., et al., Exposure to selenomethionine causes selenocysteine misincorporation and protein aggregation in Saccharomyces cerevisiae. *Sci. Rep.* 2017, 7, doi:10.1038/srep44761.

[108] Combs, G.F., Biomarkers of selenium status. *Nutrients* 2015, 7, 2209–2236.

[109] Sunde, R.A., Molecular biomarker panels for assessment of selenium status in rats. *Exp. Biol.*

Med. (Maywood). 2010, 235, 1046–1052.

[110] Speckmann, B., Steinbrenner, H., Selenium and selenoproteins in inflammatory bowel diseases and experimental colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 2014, 20, 1110–1119.

[111] Schomburg, L., Köhrle, J., On the importance of selenium and iodine metabolism for thyroid hormone biosynthesis and human health. *Mol. Nutr. Food Res.* 2008, 52, 1235–1246.

[112] Mistry, H.D., Broughton Pipkin, F., Redman, C.W.G., Poston, L., Selenium in reproductive health. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2012, 206, 21–30.

[113] Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., et al., Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science (80-.).* 1999, 285, 1393–1396.

[114] Pieczyńska, J., Grajeta, H., The role of selenium in human conception and pregnancy. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2015, 29, 31–38.

[115] Chen, J., Berry, M.J., Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J. Neurochem.* 2003, 86, 1–12.

[116] Wood, S.M., Beckham, C., Yosioka, A., Darban, H., Watson, R.R., β-Carotene and selenium supplementation enhances immune response in aged humans. *Integr. Med.* 1999, 2, 85–92.

[117] Hoffmann, F.W., Hashimoto, A.C., Shafer, L.A., Dow, S., et al., Dietary Selenium Modulates Activation and Differentiation of CD4+ T Cells in Mice through a Mechanism Involving Cellular Free Thiols. *J. Nutr.* 2010, 140, 1155–1161.

[118] Carlson, B.A., Yoo, M.-H., Shrimali, R.K., Irons, R., et al., Role of selenium-containing proteins in T-cell and macrophage function. *Proc. Nutr. Soc.* 2010, 69, 300–310.

[119] Schoenmakers, E., Agostini, M., Mitchell, C., Schoenmakers, N., et al., Mutations in the selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans. *J. Clin. Invest.* 2010, 120, 4220–4235.

[120] Duntas, L.H., Benvenga, S., Selenium: an element for life. *Endocrine* 2015, 48, 756–775.

[121] Jung, H.J., Seo, Y.R., Current issues of selenium in cancer chemoprevention. *BioFactors* 2010, 36, 153–158.

[122] Brooks, J.D., Metter, E.J., Chan, D.W., Sokoll, L.J., et al., Plasma selenium level before diagnosis and the risk of prostate cancer development. *J. Urol.* 2001, 166, 2034–2038.

[123] Bleys, J., Navas-Acien, A., Guallar, E., Serum selenium levels and all-cause, cancer, and cardiovascular mortality among US adults. *Arch. Intern. Med.* 2008, 168, 404–410.

[124] Steinbrenner, H., Speckmann, B., Klotz, L.-O., Selenoproteins: Antioxidant selenoenzymes and beyond. *Arch. Biochem. Biophys.* 2016, 595, 113–119.

[125] El-Bayoumy, K., The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2001, 475, 123–139.

[126] Chen, Y.-C., Prabhu, K.S., Das, A., Mastro, A.M., Dietary selenium supplementation modifies breast tumor growth and metastasis. *Int. J. Cancer* 2013, 133, 2054–2064.

[127] Krehl, S., Loewinger, M., Florian, S., Kipp, A.P., et al., Glutathione peroxidase-2 and selenium decreased inflammation and tumors in a mouse model of inflammation-associated carcinogenesis whereas sulforaphane effects differed with selenium supply. *Carcinogenesis* 2012, 33, 620–628.

[128] Yakubov, E., Buchfelder, M., Eyüpoglu, I.Y., Savaskan, N.E., Selenium Action in Neuro-Oncology. *Biol. Trace Elem. Res.* 2014, 161, 246–254.

[129] Puspitasari, I.M., Abdulah, R., Yamazaki, C., Kameo, S., et al., Updates on clinical studies of selenium supplementation in radiotherapy. *Radiat. Oncol.* 2014, 9, doi:10.1186/1748-717X-9-125.

[130] Tan, Q., Li, J., Yin, H.W., Wang, L.H., et al., Augmented antitumor effects of combination therapy of cisplatin with ethaselen as a novel thioredoxin reductase inhibitor on human A549 cell in vivo. *Invest. New Drugs* 2010, 28, 205–215.

[131] Clark, L.C., Combs, G.F., Turnbull, B.W., Slate, E.H., 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, 276, 1957–1963.

[132] Klein, E.A., Thompson, I.M., Lippman, S.M., Goodman, P.J., et al., SELECT: the next prostate cancer prevention trial. Selenum and Vitamin E Cancer Prevention Trial. *J. Urol.* 2001, 166, 1311–1315.

[133] Lippman, S.M., Klein, E.A., Goodman, P.J., Lucia, M.S., et al., Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA* 2009, 301, 39–51.

[134] Peters, U., Takata, Y., Selenium and the prevention of prostate and colorectal cancer. *Mol. Nutr. Food Res.* 2008, 52, 1261–1272.

[135] Duffield-Lillico, A.J., Reid, M.E., Turnbull, B.W., Combs, G.F., et al., Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2002, 11, 630–639.

[136] Waters, D.J., Chiang, E.C., Five threads: How U-shaped thinking weaves together dogs, men, selenium, and prostate cancer risk. *Free Radic. Biol. Med.* 2018, 127, 36–45.

[137] Mörk, H., al-Taie, O.H., Bähr, K., Zierer, A., et al., Inverse mRNA expression of the selenocysteine-containing proteins GI-GPx and SeP in colorectal adenomas compared with adjacent normal mucosa. *Nutr. Cancer* 2000, 37, 108–16.

[138] Murawaki, Y., Tsuchiya, H., Kanbe, T., Harada, K., et al., Aberrant expression of selenoproteins in the progression of colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2008, 259, 218–230.

[139] Banning, A., Florian, S., Deubel, S., Thalmann, S., et al., GPx2 counteracts PGE2 production by dampening COX-2 and mPGES-1 expression in human colon cancer cells. *Antioxid. Redox Signal.* 2008, 10, 1491–1500.

[140] Walshe, J., Serewko-Auret, M.M., Teakle, N., Cameron, S., et al., Inactivation of glutathione peroxidase activity contributes to UV-induced squamous cell carcinoma formation. *Cancer Res.* 2007, 67, 4751–4758.

[141] Serewko, M.M., Popa, C., Dahler, A.L., Smith, L., et al., Alterations in gene expression and activity during squamous cell carcinoma development. *Cancer Res.* 2002, 62, 3759–3765.

[142] Woenckhaus, M., Klein-Hitpass, L., Grepmeier, U., Merk, J., et al., Smoking and cancer-related gene expression in bronchial epithelium and non-small-cell lung cancers. *J. Pathol.* 2006, 210, 192–204.

[143] Naiki-Ito, A., Asamoto, M., Hokaiwado, N., Takahashi, S., et al., Gpx2 is an overexpressed gene in rat breast cancers induced by three different chemical carcinogens. *Cancer Res.* 2007, 67, 11353–11358.

[144] Banning, A., Kipp, A., Schmitmeier, S., Löwinger, M., et al., Glutathione peroxidase 2 inhibits cyclooxygenase-2-mediated migration and invasion of HT-29 adenocarcinoma cells but supports their growth as tumors in nude mice. *Cancer Res.* 2008, 68, 9746–9753.

[145] Dittrich, A.M., Meyer, H.A., Krokowski, M., Quarcoo, D., et al., Glutathione peroxidase-2 protects from allergen-induced airway inflammation in mice. *Eur. Respir. J.* 2010, 35, 1148–1154.

[146] O'Farrell, P.H., High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 1975, 250, 4007–4021.

[147] Ünlü, M., Morgan, M.E., Minden, J.S., Difference gel electrophoresis. A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 1997, 18, 2071–2077.

[148] Alban, A., David, S.O., Bjorkesten, L., Andersson, C., et al., A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: Two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* 2003, 3, 36–44.

[149] Ohlendieck, K., in:, *Methods Mol. Biol.*, vol. 1664, 2018, pp. 17–24.

[150] Kühbacher, M., Bartel, J., Hoppe, B., Alber, D., et al., The brain selenoproteome: priorities in

the hierarchy and different levels of selenium homeostasis in the brain of selenium-deficient rats. *J. Neurochem.* 2009, 110, 133–142.

[151] Hoppe, B., Bräuer, A.U., Kühbacher, M., Savaskan, N.E., et al., Biochemical analysis of selenoprotein expression in brain cell lines and in distinct brain regions. *Cell Tissue Res.* 2008, 332, 403–414.

[152] Bukalis, K., Wolf, C., Behne, D., Kyriakopoulos, A., Studies on the selenoproteome in the cultured cells of lung and trachea by gel electrophoretic techniques. *J. Chromatogr. A* 2007, 1155, 180–186.

[153] Behne, D., Kyriakopoeulos, A., Weiss-Nowak, C., Kalckloesch, M., et al., Newly found selenium-containing proteins in the tissues of the rat. *Biol. Trace Elem. Res.* 1996, 55, 99–110.

[154] Regitz-Zagrosek, V., Kyriakopoulos, A., Pleissner, K.P., Jungblut, P., et al., Effects of selenium deficiency on the rat myocardial protein pattern- investigation by two-dimensional gel electrophoresis. *Basic Res. Cardiol.* 2000, 95, 199–207.

[155] Kyriakopoulos, A., Richter, A., Pohl, T., Wolf, C., et al., Protein expression in the tissues of the cardiovascular system of the rat under selenium deficiency and adequate conditions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007, 1095, 300–304.

[156] Mahn, A. V, Toledo, H.M., Ruz, M.H., Organic and inorganic selenium compounds produce different protein patterns in the blood plasma of rats. *Biol. Res.* 2009, 42, 163–173.

[157] Mahn, A. V, Muñoz, M.C., Zamorano, M.J., Discovery of biomarkers that reflect the intake of sodium selenate by nutritional proteomics. *J. Chromatogr. Sci.* 2009, 47, 840–843.

[158] Mahn, A. V., Toledo, H.M., Ruz, M., Dietary supplementation with selenomethylselenocysteine produces a differential proteomic response. *J. Nutr. Biochem.* 2009, 20, 791–799.

[159] Fu, L., Yan, X., Ruan, X., Lin, J., Wang, Y., Differential protein expression of Caco-2 cells treated with selenium nanoparticles compared with sodium selenite and selenomethionine. *Nanoscale Res. Lett.* 2014, 9, 589.

[160] Fu, L., Liu, Q., Shen, L., Wang, Y., Proteomic study on sodium selenite-induced apoptosis of human cervical cancer HeLa cells. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2011, 25, 130–137.

[161] Hammad, G., Legrain, Y., Touat-Hamici, Z., Duhieu, S., et al., Interplay between Selenium Levels and Replicative Senescence in WI-38 Human Fibroblasts: A Proteomic Approach. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 2018, 7, doi:10.3390/antiox7010019.

[162] Reeves, P.G., Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet. *Exp. Biol.* 1997, 127, 838–841.

[163] Lennicke, C., Rahn, J., Kipp, A.P., Dojčinović, B.P., et al., Individual effects of different selenocompounds on the hepatic proteome and energy metabolism of mice. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2017, 1861, 3323–3334.

[164] Müller, M.F., Florian, S., Pommer, S., Osterhoff, M., et al., Deletion of glutathione peroxidase-2 inhibits azoxymethane-induced colon cancer development. *PLoS One* 2013, 8, e72055.

[165] Chomczynski, P., Sacchi, N., The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate – phenol – chloroform extraction : twenty-something years on. *Nat. Protoc.* 2006, 1, 581–585.

[166] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., et al., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1986, 51, 263–273.

[167] Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., et al., Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 2012, 13, 134.

[168] Pfaffl, M.W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29, e45.

[169] Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of

protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248–254.

[170] Westermeier, R., Scheibe, B., Difference gel electrophoresis based on lys/cys tagging. *Methods Mol. Biol.* 2008, 424, 73–85.

[171] Hurd, T.R., Prime, T.A., Harbour, M.E., Lilley, K.S., Murphy, M.P., Detection of reactive oxygen species-sensitive thiol proteins by redox difference gel electrophoresis: Implications for mitochondrial redox signaling. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 22040–22051.

[172] Poschmann, G., Grzendowski, M., Stefanski, A., Bruns, E., et al., Redox proteomics reveal stress responsive proteins linking peroxiredoxin-1 status in glioma to chemosensitivity and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* 2015, 1854, 624–631.

[173] Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A., Lunardi, J., in:, *Electrophoresis*, vol. 18, 1997, pp. 307–316.

[174] Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227, 680–685.

[175] Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W., Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 1988, 9, 255–262.

[176] Karas, M., Hillenkamp, F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 1988, 60, 2299–2301.

[177] Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., et al., Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1988, 2, 151–153.

[178] Mitchell, J.W., Atkins, N., Sweedler, J. V, Gillette, M.U., Direct cellular peptidomics of hypothalamic neurons. *Front. Neuroendocrinol.* 2011, 32, 377–386.

[179] Pappin, D.J.C., Hojrup, P., Bleasby, A.J., Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol.* 1993, 7, 115–124.

[180] Mi, H., Poudel, S., Muruganujan, A., Casagrande, J.T., Thomas, P.D., PANTHER version 10: Expanded protein families and functions, and analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 2016, 44, D336–D342.

[181] Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., et al., STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43, D447-452.

[182] Böcher, M., Böldicke, T., Kieß, M., Bilitewski, U., Synthesis of mono- and bifunctional peptide-dextran conjugates for the immobilization of peptide antigens on ELISA plates: Properties and application. *J. Immunol. Methods* 1997, 208, 191–202.

[183] Dreher, I., Schmutzler, C., Jakob, F., Köhrle, J., Expression of selenoproteins in various rat and human tissues and cell lines. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 1997, 11, 83–91.

[184] Yagublu, V., Arthur, J.R., Babayeva, S.N., Nicol, F., et al., Expression of selenium-containing proteins in human colon carcinoma tissue. *Anticancer Res.* 2011, 31, 2693–2698.

[185] Thimmulappa, R.K., Mai, K.H., Srisuma, S., Kensler, T.W., et al., Identification of Nrf2-regulated Genes Induced by the Chemopreventive Agent Sulforaphane by Oligonucleotide Microarray. *Cancer Res.* 2002, 62, 5196–5203.

[186] Fisher, A.B., Peroxiredoxin 6: A Bifunctional Enzyme with Glutathione Peroxidase and Phospholipase A 2 Activities. *Antioxid. Redox Signal.* 2011, 15, 831–844.

[187] Lennicke, C., Rahn, J., Wickenhauser, C., Lichtenfels, R., et al., Loss of epithelium-specific GPx2 results in aberrant cell fate decisions during intestinal differentiation. *Oncotarget* 2018, 9, 539–552.

[188] Erickson, N.A., Mundhenk, L., Giovannini, S., Glauben, R., et al., Role of goblet cell protein CLCA1 in murine DSS colitis. *J. Inflamm. (Lond).* 2016, 13, doi:10.1186/s12950-016-0113-8.

[189] Loewen, M.E., Forsyth, G.W., Structure and function of CLCA proteins. *Physiol. Rev.* 2005, 85, 1061–1092.

[190] Jasinski-Bergner, S., Stehle, F., Gonschorek, E., Kalich, J., et al., Identification of 14-3-3 beta Gene as a novel miR-152 target using a proteome-based approach. *J. Biol. Chem.* 2014, 289, 31121–31135.

[191] Lichtenfels, R., Mougiakakos, D., Johansson, C.C., Dressler, S.P., et al., Comparative expression profiling of distinct T cell subsets undergoing oxidative stress. *PLoS One* 2012, 7, e41345.

[192] Lichtenfels, R., Ackermann, A., Kellner, R., Seliger, B., Mapping and expression pattern analysis of key components of the major histocompatibility complex class I antigen processing and presentation pathway in a representative human renal cell carcinoma cell line. *Electrophoresis* 2001, 22, 1801–1809.

[193] Steven, A., Leisz, S., Wickenhauser, C., Schulz, K., et al., Linking CREB function with altered metabolism in murine fibroblast-based model cell lines. *Oncotarget* 2017, 8, 97439–97463.

[194] Croci, S., Recktenwald, C. V., Lichtenfels, R., Nicoletti, G., et al., Proteomic and PROTEOMEX profiling of mammary cancer progression in a HER-2/neu oncogene-driven animal model system. *Proteomics* 2010, 10, 3835–3853.

[195] Madureira, P.A., Waisman, D.M., Annexin A2: the importance of being redox sensitive. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 3568–3594.

[196] Tanida, S., Mizoshita, T., Ozeki, K., Katano, T., et al., Advances in refractory ulcerative colitis treatment: A new therapeutic target, Annexin A2. *World J. Gastroenterol.* 2015, 21, 8776–8786.

[197] Hiller, F., Oldorff, L., Besselt, K., Kipp, A.P., Differential acute effects of selenomethionine and sodium selenite on the severity of colitis. *Nutrients* 2015, 7, 2687–2706.

[198] Rozakis-Adcock, M., McGlade, J., Mbamalu, G., Pelicci, G., et al., Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* 1992, 360, 689–692.

[199] Ahmed, Z., Timsah, Z., Suen, K.M., Cook, N.P., et al., Grb2 monomer-dimer equilibrium determines normal versus oncogenic function. *Nat. Commun.* 2015, 6, 7354.

[200] Bravo-Cordero, J.J., Magalhaes, M.A.O., Eddy, R.J., Hodgson, L., Condeelis, J., Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013, 14, 405–417.

[201] Sinha, R., Pinto, J.T., Facompre, N., Kilheffer, J., et al., Effects of naturally occurring and synthetic organoselenium compounds on protein profiling in androgen responsive and androgen independent human prostate cancer cells. *Nutr. Cancer* 2008, 60, 267–275.

[202] Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D., The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000, 1, 11–21.

[203] Erickson, N.A., Nyström, E.E.L., Mundhenk, L., Arike, L., et al., The Goblet Cell Protein Clca1 (Alias mClca3 or Gob-5) Is Not Required for Intestinal Mucus Synthesis, Structure and Barrier Function in Naive or DSS-Challenged Mice. *PLoS One* 2015, 10, e0131991.

[204] Birchenough, G.M.H., Johansson, M.E., Gustafsson, J.K., Bergström, J.H., Hansson, G.C., New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunol.* 2015, 8, 712–719.

[205] Yang, B., Cao, L., Liu, B., McCaig, C.D., Pu, J., The Transition from Proliferation to Differentiation in Colorectal Cancer Is Regulated by the Calcium Activated Chloride Channel A1. *PLoS One* 2013, 8, e60861.

[206] Kudva, A.K., Shay, A.E., Prabhu, K.S., Selenium and inflammatory bowel disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2015, 309, G71-77.

[207] Posorski, N., Kaemmerer, D., Ernst, G., Grabowski, P., et al., Localization of sporadic neuroendocrine tumors by gene expression analysis of their metastases. *Clin. Exp. Metastasis* 2011, 28, 637–647.

[208] Jancova, P., Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E., Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* 2010, 154, 103–116.

[209] Leung, A.W.Y., Backstrom, I., Bally, M.B., Sulfonation, an underexploited area: from skeletal development to infectious diseases and cancer. *Oncotarget* 2016, 7, 55811–55827.

[210] Dawson, P.A., Huxley, S., Gardiner, B., Tran, T., et al., Reduced mucin sulfonation and impaired intestinal barrier function in the hyposulfataemic NaS1 null mouse. *Gut* 2009, 58, 910–919.

[211] Raouf, A.H., Tsai, H.H., Parker, N., Hoffman, J., et al., Sulphation of colonic and rectal mucin in inflammatory bowel disease: reduced sulphation of rectal mucus in ulcerative colitis. *Clin. Sci. (Lond).* 1992, 83, 623–626.

[212] Clevers, H., Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006, 127, 469–480.

[213] Bach, S.P., Renehan, A.G., Potten, C.S., Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis* 2000, 21, 469–476.

[214] Mariadason, J.M., Bordonaro, M., Aslam, F., Shi, L., et al., Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation. *Cancer Res.* 2001, 61, 3465–3471.

[215] Marji, J., O'Donoghue, S.I., McClintock, D., Satagopam, V.P., et al., Defective lamin A-Rb signaling in Hutchinson-Gilford progeria syndrome and reversal by farnesyltransferase inhibition. *PLoS One* 2010, 5, e11132.

[216] Sieprath, T., Darwiche, R., De Vos, W.H., Lamins as mediators of oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012, 421, 635–639.

[217] Reddy, K.L., Zullo, J.M., Bertolino, E., Singh, H., Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature* 2008, 452, 243–247.

[218] Andrés, V., González, J.M., Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization. *J. Cell Biol.* 2009, 187, 945–957.

[219] Dechat, T., Shimi, T., Adam, S.A., Rusinol, A.E., et al., Alterations in mitosis and cell cycle progression caused by a mutant lamin A known to accelerate human aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007, 104, 4955–4960.

[220] Gonzalez-Suarez, I., Redwood, A.B., Perkins, S.M., Vermolen, B., et al., Novel roles for A-type lamins in telomere biology and the DNA damage response pathway. *EMBO J.* 2009, 28, 2414–2427.

[221] Bakay, M., Wang, Z., Melcon, G., Schiltz, L., et al., Nuclear envelope dystrophies show a transcriptional fingerprint suggesting disruption of Rb-MyoD pathways in muscle regeneration. *Brain* 2006, 129, 996–1013.

[222] Boguslavsky, R.L., Stewart, C.L., Worman, H.J., Nuclear lamin A inhibits adipocyte differentiation: Implications for Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2006, 15, 653–663.

[223] Constantinescu, D., Gray, H.L., Sammak, P.J., Schatten, G.P., Csoka, A.B., Lamin A/C Expression Is a Marker of Mouse and Human Embryonic Stem Cell Differentiation. *Stem Cells* 2006, 24, 177–185.

[224] Maresca, G., Natoli, M., Nardella, M., Arisi, I., et al., LMNA Knock-Down Affects Differentiation and Progression of Human Neuroblastoma Cells. *PLoS One* 2012, 7, 1–14.

[225] Bermeo, S., Vidal, C., Zhou, H., Duque, G., Lamin A/C Acts as an Essential Factor in Mesenchymal Stem Cell Differentiation Through the Regulation of the Dynamics of the Wnt/beta-Catenin Pathway. *J. Cell. Biochem.* 2015, 116, 2344–2353.

[226] Rahn, J., Lennicke, C., Kipp, A.P., Müller, A.S., et al., Altered protein expression pattern in colon tissue of mice upon supplementation with distinct selenium compounds. *Proteomics* 2017, 17, doi: 10.1002/pmic.201600486.

[227] Winterbourn, C.C., Hampton, M.B., Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 2008, 45, 549–561.

[228] Berg, K.C.G., Eide, P.W., Eilertsen, I.A., Johannessen, B., et al., Multi-omics of 34 colorectal

cancer cell lines - a resource for biomedical studies. *Mol. Cancer* 2017, 16, doi: 10.1186/s12943-017-0691-y.

[229] Bertz, M., Kühn, K., Koeberle, S.C., Müller, M.F., et al., Selenoprotein {H} controls cell cycle progression and proliferation of human colorectal cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2018, 127, 98–107.

[230] Barrera, L.N., Johnson, I.T., Bao, Y., Cassidy, A., Belshaw, N.J., Colorectal cancer cells Caco-2 and HCT116 resist epigenetic effects of isothiocyanates and selenium in vitro. *Eur. J. Nutr.* 2013, 52, 1327–1341.

[231] Li, Z., Meng, J., Xu, T.-J., Qin, X.-Y., Zhou, X.-D., Sodium selenite induces apoptosis in colon cancer cells via Bax-dependent mitochondrial pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2013, 17, 2166–71.

[232] Chiu, S.-T., Hsieh, F.-J., Chen, S.-W., Chen, C.-L., et al., Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using cDNA microarray and real-time reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005, 14, 437–443.

[233] Xu, X.H., Pan, W., Kang, L.H., Feng, H., Song, Y.Q., Association of Annexin A2 with cancer development (review). *Oncol. Rep.* 2015, 33, 2121–2128.

[234] Lu, L., Fu, N., Luo, X., Li, X.Y., Li, X.P., Overexpression of cofilin 1 in prostate cancer and the corresponding clinical implications. *Oncol. Lett.* 2015, 9, 2757–2761.

[235] Collazo, J., Zhu, B., Larkin, S., Martin, S.K., et al., Cofilin drives cell-invasive and metastatic responses to TGF-β in prostate cancer. *Cancer Res.* 2014, 74, 2362–2373.

[236] Tang, Q., Ji, Q., Tang, Y., Chen, T., et al., Mitochondrial translocation of cofilin-1 promotes apoptosis of gastric cancer BGC-823 cells induced by ursolic acid. *Tumour Biol.* 2014, 35, 2451–2459.

[237] Willis, N.D., Cox, T.R., Rahman-Casañs, S.F., Smits, K., et al., Lamin A/C is a risk biomarker in colorectal cancer. *PLoS One* 2008, 3, e2988.

[238] Wang, A.S., Kozlov, S. V., Stewart, C.L., Horn, H.F., Tissue specific loss of A-type lamins in the gastrointestinal epithelium can enhance polyp size. *Differentiation* 2015, 89, 11–21.

[239] Belt, E.J.T., Fijneman, R.J.A., van den Berg, E.G., Bril, H., et al., Loss of lamin A/C expression in stage II and III colon cancer is associated with disease recurrence. *Eur. J. Cancer* 2011, 47, 1837–1845.

[240] Brigelius-Flohé, R., Kipp, A.P., Selenium in the redox regulation of the Nrf2 and the Wnt pathway. *Methods Enzymol.* 2013, 527, 65–86.

[241] Müller, M., Banning, A., Brigelius-Flohé, R., Kipp, A., Nrf2 target genes are induced under marginal selenium-deficiency. *Genes Nutr.* 2010, 5, 297–307.

[242] Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., et al., Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* 2015, 6, 183–197.

[243] Miyamoto, N., Izumi, H., Miyamoto, R., Kondo, H., et al., Quercetin induces the expression of peroxiredoxins 3 and 5 via the Nrf2/NRF1 transcription pathway. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011, 52, 1055–1063.

[244] Xu, Q., Huff, L.P., Fujii, M., Griendling, K.K., Redox regulation of the actin cytoskeleton and its role in the vascular system. *Free Radic. Biol. Med.* 2017, 109, 84–107.

[245] Wilson, C., Terman, J.R., González-Billault, C., Ahmed, G., Actin filaments—A target for redox regulation. *Cytoskeleton* 2016, 73, 577–595.

[246] Wilson, C., González-Billault, C., Regulation of cytoskeletal dynamics by redox signaling and oxidative stress: implications for neuronal development and trafficking. *Front. Cell. Neurosci.* 2015, 9, 381.

[247] Terman, J.R., Kashina, A., Post-translational modification and regulation of actin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2013, 25, 1–9.

[248] Go, Y.-M., Duong, D.M., Peng, J., P. Jones, D., Protein Cysteines Map to Functional Networks According to Steady-state Level of Oxidation. *J. Proteomics Bioinform.* 2011, 4,

196–209.

[249] Kilic, F., Dalton, M.B., Burrell, S.K., Mayer, J.P., et al., In vitro assay and characterization of the farnesylation-dependent prelamin A endoprotease. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 5298–5304.

[250] Sinensky, M., Fantle, K., Trujillo, M., McLain, T., et al., The processing pathway of prelamin A. *J. Cell Sci.* 1994, 107, 61–67.

[251] Reynaud, E., Prelamin A endoproteolytic processing in vitro by recombinant Zmpste24. *Nat. Educ.* 2010, 387, 129–138.

[252] Fernandes, J., Hu, X., Ryan Smith, M., Go, Y.-M., Jones, D.P., Selenium at the Redox Interface of the Genome, Metabolome and Exposome. *Free Radic. Biol. Med.* 2018, 127, 215–227.

[253] Weekley, C.M., Aitken, J.B., Vogt, S., Finney, L.A., et al., Uptake, distribution, and speciation of selenoamino acids by human cancer cells: X-ray absorption and fluorescence methods. *Biochemistry* 2011, 50, 1641–1650.

[254] Ganther, H.E., Lawrence, J.R., Chemical transformations of selenium in living organisms. Improved forms of selenium for cancer prevention. *Tetrahedron* 1997, 53, 12299–12310.

[255] Wu, C.L., Chou, H.C., Cheng, C.S., Li, J.M., et al., Proteomic analysis of UVB-induced protein expression- and redox-dependent changes in skin fibroblasts using lysine- and cysteine-labeling two-dimensional difference gel electrophoresis. *J. Proteomics* 2012, 75, 1991–2014.

[256] Nevalainen, T.J., 1-Cysteine peroxiredoxin: A dual-function enzyme with peroxidase and acidic Ca2+-independent phospholipase A2 activities. *Biochimie* 2010, 92, 638–644.

[257] Manevich, Y., Feinstein, S.I., Fisher, A.B., Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with GST. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004, 101, 3780–3785.

[258] Choi, H.J., Kang, S.W., Yang, C.H., Rhee, S.G., Ryu, S.E., Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 A resolution. *Nat Struct Biol* 1998, 5, 400–406.

[259] Manevich, Y., Fisher, A.B., Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 2005, 38, 1422–1432.

[260] Monteiro, G., Horta, B.B., Pimenta, D.C., Augusto, O., Netto, L.E.S., Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007, 104, 4886–4891.

[261] Fisher, A.B., Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling. *Arch. Biochem. Biophys.* 2017, 617, 68–83.

[262] Ralat, L.A., Misquitta, S.A., Manevich, Y., Fisher, A.B., Colman, R.F., Characterization of the complex of glutathione S-transferase pi and 1-cysteine peroxiredoxin. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008, 474, 109–118.

[263] Ralat, L.A., Manevich, Y., Fisher, A.B., Colman, R.F., Direct evidence for the formation of a complex between 1-cysteine peroxiredoxin and glutathione S-transferase pi with activity changes in both enzymes. *Biochemistry* 2006, 45, 360–372.

[264] Ghezzi, P., Chan, P., Redox Proteomics Applied to the Thiol Secretome. *Antioxid. Redox Signal.* 2017, 26, 299–312.

[265] Jiang, J., Wang, K., Nice, E.C., Zhang, T., Huang, C., High-throughput screening of cellular redox sensors using modern redox proteomics approaches. *Expert Rev. Proteomics* 2015, 12, 543–55.

[266] McDonagh, B., Diagonal electrophoresis for the detection of protein disulfides. *Methods Mol. Biol.* 2012, 869, 309–15.

[267] Samelson, L.E., Diagonal gel electrophoresis. *Curr. Protoc. Immunol.* 2001.

[268] Peskin, A. V., Dickerhof, N., Poynton, R.A., Paton, L.N., et al., Hyperoxidation of peroxiredoxins 2 and 3: Rate constants for the reactions of the sulfenic acid of the peroxidatic cysteine. *J. Biol. Chem.* 2013, 288, 14170–14177.

[269] Gao, X.H., Bedhomme, M., Veyel, D., Zaffagnini, M., Lemaire, S.D., Methods for analysis of protein glutathionylation and their application to photosynthetic organisms. *Mol. Plant* 2009, 2, 218–235.

[270] Woo, H., Rhee, S., Immunoblot Detection of Proteins That Contain Cysteine Sulfinic or Sulfonic Acids with Antibodies Specific for the Hyperoxidized Cysteine Containing Sequence. *J Biol Chem* 2010, 278, 47361–47364.

[271] Chouchani, E.T., Hurd, T.R., Nadtochiy, S.M., Brookes, P.S., et al., Identification of S-nitrosated mitochondrial proteins by S-nitrosothiol difference in gel electrophoresis (SNO-DIGE): implications for the regulation of mitochondrial function by reversible S-nitrosation. *Biochem. J* 2010, 430, 49–59.

[272] Saurin, A.T., Neubert, H., Brennan, J.P., Eaton, P., Widespread sulfenic acid formation in tissues in response to hydrogen peroxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004, 101, 17982–17987.

[273] Fu, C., Hu, J., Liu, T., Ago, T., et al., Quantitative analysis of redox-sensitive proteome with DIGE and ICAT. *J. Proteome Res.* 2008, 7, 3789–802.

[274] Baker, M.A., Weinberg, A., Hetherington, L., Villaverde, A.I.S.B., Velkov, T., Analysis of Protein Thiol Changes Occurring During Rat Sperm Epididymal Maturation. *Biol. Reprod.* 2015, 92, 1–10.

[275] Leichert, L.I., Gehrke, F., Gudiseva, H. V., Blackwell, T., et al., Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008, 105, 8197–8202.

[276] Murray, C.I., Chung, H.S., Uhrigshardt, H., Van Eyk, J.E., Quantification of mitochondrial S-Nitrosylation by CysTMT^6 switch assay. *Methods Mol. Biol.* 2013, 1005, 169–179.

[277] Murray, C.I., Uhrigshardt, H., O'Meally, R.N., Cole, R.N., Van Eyk, J.E., Identification and Quantification of S-Nitrosylation by Cysteine Reactive Tandem Mass Tag Switch Assay. *Mol. Cell. Proteomics* 2012, 11, M111.013441.

[278] Pan, K.-T., Chen, Y.-Y., Pu, T.-H., Chao, Y.-S., et al., Mass Spectrometry-Based Quantitative Proteomics for Dissecting Multiplexed Redox Cysteine Modifications in Nitric Oxide-Protected Cardiomyocyte Under Hypoxia. *Antioxid. Redox Signal.* 2014, 20, 1365–1381.

[279] Held, J.M., Danielson, S.R., Behring, J.B., Atsriku, C., et al., Targeted Quantitation of Site-Specific Cysteine Oxidation in Endogenous Proteins Using a Differential Alkylation and Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry Approach. *Mol. Cell. Proteomics* 2010, 9, 1400–1410.

[280] Li, Y., Luo, Z., Wu, X., Zhu, J., et al., Proteomic Analyses of Cysteine Redox in High-Fat-Fed and Fasted Mouse Livers: Implications for Liver Metabolic Homeostasis. *J. Proteome Res.* 2018, 17, 129–140.

[281] Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E., Rizzuto, R., Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca2+ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* 2008, 27, 6407–6418.

[282] Pitts, M.W., Hoffmann, P.R., Endoplasmic reticulum-resident selenoproteins as regulators of calcium signaling and homeostasis. *Cell Calcium* 2018, 70, 76–86.

[283] Acedo, P., Fernandes, A., Zawacka-Pankau, J., Activation of TAp73 and inhibition of thioredoxin reductase for improved cancer therapy in TP53 mutant pancreatic tumors. *bioRxiv* 2018.

PUBLIKATIONSLISTE

Wissenschaftliche Artikel

Lennicke C, Rahn J, Wickenhauser C, Lichtenfels R, Müller AS, Wessjohann LA, Kipp AP and Seliger B. Loss of epithelium-specific GPx2 results in aberrant cell fate decisions during intestinal differentiation. Oncotarget. 2018 9(1):539-552.

Rahn J, Lennicke C, Kipp AP, Müller AS, Wessjohann LA, Lichtenfels R and Seliger B. Altered protein expression pattern in colon tissue of mice upon supplementation with distinct selenium compounds. Proteomics. 2017 Jun;17(11), doi:10.1002/pmic.201600486.

Lennicke C, Rahn J, Kipp AP, Dojčinović BP, Müller AS, Wessjohann LA, Lichtenfels R and Seliger B. Individual effects of different selenocompounds on the hepatic proteome and the energy metabolism of mice. Biochim Biophys Acta. 2017, 1861, 3323–3334.

Lennicke C, Rahn J, Bukur J, Hochgräfe F, Wessjohann LA, Lichtenfels R and Seliger B. Modulation of MHC class I surface expression in B16F10 melanoma cells by methylseleninic acid. Oncoimmunology. 2016 Dec 21;6(6):e1259049.

Review-Artikel

Lennicke C, Rahn J, Heimer N, Lichtenfels R, Wessjohann LA and Seliger B. Redox proteomics: Methods for the identification and enrichment of redox-modified proteins and their applications. *Proteomics*. 2016 Jan;16(2):197-213.

Lennicke C, Rahn J, Lichtenfels R, Wessjohann LA and Seliger B. Hydrogen peroxide - production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Commun Signal*. 2015 Sep 14;13:39, doi:10.1186/s12964-015-0118-6.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der aufgeführten Literatur und der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben und die den benutzen Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben.

Diese Arbeit wurde keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung vorgelegt.

Halle (Saale), 09.01.2019 …….

Jette Rahn

LEBENSLAUF

Jette Rahn
geboren am 08. April 1988 in Weimar

Berufserfahrung

Seit 07/2018	**Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Forschungslabor des Mitteldeutschen Herzzentrums am Universitätsklinikum Halle, Halle (Saale)** Projekt: Identifizierung AGE-modifizierter Proteine im *Liquor cerebrospinalis* von Patienten mit Alzheimer im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (EFRE gefördert)
10/2013 – 06/2018	**Doktorandin, Institut für Medizinische Immunologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)** Thema der Doktorarbeit: Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Selenverbindungen auf das Proteom von murinem Kolongewebe mittels 2D-Gelelektrophorese (DFG gefördert)
10/2012 - 09/2013	**Doktorandin, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale),** Arbeitsthema: Untersuchungen zu anti-inflammatorischen Effekten von phytogenen Futterzusätzen (finanziert durch ein Stipendium der H. Wilhelm-Schaumann Stiftung zu Hamburg)

Ausbildung

10/2006 - 03/2012	**Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**, **Halle (Saale)** Diplom-Ernährungswissenschaftlerin; Abschlussnote: 1.4
08/1998 - 03/2006	**Hoffmann-von-Fallersleben Gymnasium, Weimar** Abschlussnote: 1.9

Auszeichnungen

03/2012	Beste Studienleistung ausgezeichnet durch die H. Wilhelm-Schaumann Stiftung zu Hamburg

Zusätzliche Fähigkeiten

Sprachen:	• Deutsch: Muttersprache Englisch: konversationssicher
Computer:	• Bruker Ultraflex MALDI-TOF MS Software-Paket, Grundkenntnisse • Delta2D, Fortbildung 04/2016 • IBM SPSS, Grundkenntnisse • MS Office (Word, Excel, Power-Point), erweiterte Kenntnisse
Sonstiges:	• Betrieblicher Ersthelfer

Halle (Saale), 09.01.2019 ……..

Jette Rahn

DANKSAGUNG

Im Folgenden möchte ich mich bei Personen bedanken, ohne deren Unterstützung und Hilfe die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Frau Prof. Barbara Seliger danke ich für die Überlassung des spannenden Themas sowie für die Möglichkeit viele mir neue Methoden kennenzulernen als auch fundierten wissenschaftlichen Diskussionen.

Herrn PD Dr. Kaatz sowie Herrn Prof. Stevanović danke ich recht herzlich für die Bereitschaft die Begutachtung meiner Arbeit zu übernehmen.

Ein sehr großes Dankeschön geht an Claudia. Du warst das Zugpferd des DFG-Projektes und hast mit durch zahlreiche kritische Diskussionen in meiner wissenschaftlichen Denkweise vorangebracht. Über die Jahre sind wird gute Freunde geworden und an unsere gemeinsamen Reisen als auch traditionellen Montagabende denke ich immer gern zurück.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Lichtenfels („Rudi“). Er hat mir auf seine ganz eigene Art und Weise die „Liebe“ zu dem Handwerk der 2D-Gele nähergebracht und war in allen wissenschaftlichen Lebenslagen ein hilfsbereiter Ansprechpartner. Nicht nur die unzähligen Stunden des gemeinsamen Abwaschens hat Rudi stets mit seinem Wortwitz bereichert, wovon vieles in meinen eigenen Wortschatz übergegangen ist.

Ein weiteres herzliches Dankeschön gilt allen Wegbegleitern am Institut für Medizinische Immunologie. Franzi und Kristin danke ich für die Bereitschaft mich mit dem notwendigen Wissen für die „Masse“ zu versorgen. Ebenfalls möchte ich mich bei Nicole für ihre stete Unterstützung bei Problemen bürokratischer Natur bedanken. Weiter danke ich Nadine, Micha, Chris, Sandy, Karthik, Marifili, André und allen anderen Kollegen für die tolle Zusammenarbeit und die zahlreichen Abende an denen Wissenschaft auch mal nicht an erster Stelle stand.

Auch bei meinen Freunden und dabei insbesondere der JAJA- und VfL M&M-Gruppe sowie Christoph und Thomas K möchte ich mich für das Interesse und die Unterstützung bedanken. Insbesondere meine Volleyballmädels können sich vielleicht nicht vorstellen, wie wichtig mir unsere gemeinsame Zeit auf dem Feld als auch privat war, um einfach mal den Kopf frei zubekommen.

Nicht zuletzt gilt das größte Dankeschön meiner Familie, vor allem meiner Mutter, die mich auf meinem gesamten Weg bedingungslos unterstützt hat. Auch meinem Bruder und seiner Familie sowie Thomas H und den Omas danke ich für die immerwährende Hilfe und Unterstützung in allen Lebenslagen.

ANHANG

Tabelle A-1: Einfluss verschiedener Se-Verbindungen auf mRNA-Konzentration und Enzymaktivität anti-oxidativer Selenoproteine im murinen Kolongewebe.

	-Se	Selenit		Selenat		SeMet	
		ad	ho	ad	ho	ad	ho
mRNA-Konzentration							
Gpx1	1.00 ± 0.11	4.82 ± 0.13*	4.82 ± 0.17*	4.56 ± 0.24*	4.86 ± 0.19*	4.96 ± 0.21*	5.15 ± 0.20*
Gpx2	1.00 ± 0.18	0.95 ± 0.13	1.02 ± 0.15	0.77 ± 0.14	0.95 ± 0.15	0.85 ± 0.10	1.20 ± 0.15
Txnrd1	1.00 ± 0.15	1.42 ± 0.16	1.28 ± 0.18	1.42 ± 0.13	1.31 ± 0.18	1.31 ± 0.17	1.28 ± 0.11
Enzymaktivität							
GPx	8.15 ± 1.33	136 ± 8.22*[a]	133 ± 7.90*	115 ± 5.56*[b]	130 ± 8.33*	126 ± 5.18*	143 ± 7.24*
TXNRD	2.51 ± 0.21	11.7 ± 0.34*	10.9 ± 0.87*	10.9 ± 0.55*	11 ± 0.80*	10.9 ± 1.09*	11.4 ± 1.53*

Dargestellt sind MW ± SEM relativ zur Se-Mangel-Gruppe (n=8). Werte markiert mit einem * stellen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Se-Mangel-Gruppe dar und kleine Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Se-supplementierten Gruppen($p < 0,05$; ANOVA). Die Bestimmung der Enzymaktivitäten wurde von Frau Claudia Lennicke durchgeführt. –Se, Se-Mangel; ad, adäquat (150 µg Se/kg Diät); ho, hoch (750 µg Se/kg Diät); GPx, Glutathionperoxidase; TXNRD/Txnrd, Thioredoxinreduktase.

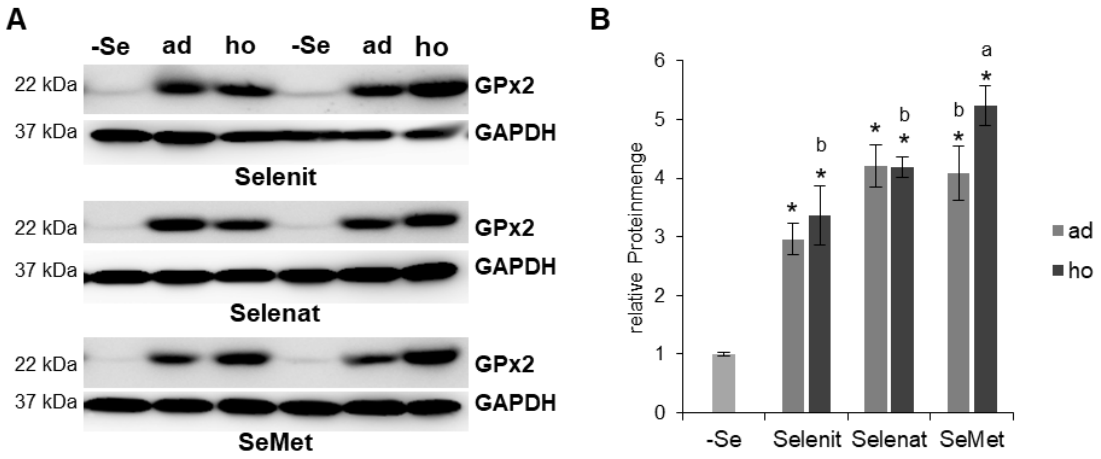

Abbildung A-1:Einfluss der Se-Supplementierungen auf die GPx2-Proteinmenge.

Die Bestimmung der Proteinexpression mittels Western Blot wurde wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben durchgeführt. (A) zeigt einen repräsentativen Western Blot und (B) die Auswertung der Proteinmengen normalisiert auf die Proteinmenge der GAPDH (n=4). Dargestellt sind MW ± SEM relativ zur Se-Mangel-Gruppe. Werte markiert mit einem * stellen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Se-Mangel-Gruppe dar ($p < 0,05$; ANOVA) und kleine Hochbuchstaben signifikante Unterschiede innerhalb der Se-supplementierten Gruppen. ad, adäquat (150 µg Se/kg Diät); ho, hoch (750 µg Se/kg Diät).

Tabelle A-2: Einfluss verschiedener Se-Verbindungen auf die mRNA-Expression von Glutathion-S-Transferasen im murinen Kolongewebe.

Glutathion-S-Transferase (Gst)	-Se	Selenit		Selenat		SeMet	
		ad	ho	ad	ho	ad	ho
Gsta4	1.00 ± 0.11	0.99 ± 0.05	0.94 ± 0.06	0.97 ± 0.08	1.01 ± 0.06	1.08 ± 0.06	1.01 ± 0.09
Gstm1	1.00 ± 0.21	0.74 ± 0.11	0.84 ± 0.11	0.72 ± 0.09	0.96 ± 0.11	1.00 ± 0.13	0.96 ± 0.06
Gstpi1	1.00 ± 0.09	1.07 ± 0.07	0.94 ± 0.07	1.02 ± 0.09	1.01 ± 0.06	0.97 ± 0.05	0.90 ± 0.05

Dargestellt sind MW ± SEM relativ zur Se-Mangel-Gruppe (n=8). Werte markiert mit einem * stellen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Se-Mangel-Gruppe dar ($p < 0,05$; ANOVA). –Se, Se-Mangel; ad, adäquat (150 µg Se/kg Diät); ho, hoch (750 µg Se/kg Diät).