JUSTUS-LIEBIG-
UNIVERSITÄT
GIESSEN

# Einfluss von Natriumselenit und Natriumselenat in nutritiver und supranutritiver Dosis auf die Aktivität und Expression von Seleno-enzymen sowie auf das antioxidative Schutzsystem der Ratte

Astrid Christina Bosse

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. agr.)
am Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität, Gießen

Aus dem Institut für Tierernährung und
Ernährungsphysiologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. J. Pallauf

# Einfluss von Natriumselenit und Natriumselenat in nutritiver und supranutritiver Dosis auf die Aktivität und Expression von Selenoenzymen sowie auf das antioxidative Schutzsystem der Ratte

**Inauguraldissertation**
zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. agr.)
am Fachbereich Agrarwissenschaften,
Ökotrophologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität, Gießen

vorgelegt von
**Astrid Christina Bosse**

Gießen 2007

Dissertation am Fachbereich
Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Roland Herrmann

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Steffen Hoy

1. Gutachter: Prof. Dr. Josef Pallauf

2. Gutachter: Prof. Dr. Edgar Weigand

1. Prüfer: Prof. Dr. Dr. h.c. Wilhelm Opitz von Boberfeld

2. Prüferin: Prof. Dr. Irmgard Bitsch

Tag der mündlichen Prüfung: 09. August 2007

# INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis……I
Abkürzungsverzeichnis……III
Abbildungsverzeichnis……V
Tabellenverzeichnis……VII

1 Einleitung ....1
2 Literaturübersicht ....3
2.1 Selen ....3
2.1.1 Geschichte ....3
2.1.2 Allgemeine chemische und physikalische Eigenschaften von Selen ....4
2.1.3 Selenhomöostase ....5
2.1.4 Biosynthese von Selenoproteinen ....10
2.1.5 Selenoproteine ....12
2.1.5.1 Cytosolische Glutathionperoxidase (cGPx) .... 13
2.1.5.2 Plasmatische Glutathionperoxidase (pGPx) .... 15
2.1.5.3 Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase (PHGPx) .... 16
2.1.5.4 Thioredoxinreduktase (TrxR) .... 18
2.1.6 Regulation der Genexpression von Selenoproteinen ....20
2.1.7 Selenstatus (Se-Mangel, supranutritive Se-Aufnahme, Se-Toxizität) ..23
2.2 Physiologische Folgen von Oxidativem Stress ....29
2.2.1 Oxidativer Stress ....29
2.2.2 Radikalentstehung ....30
2.2.3 Antioxidative Schutz- und Kontrollmechanismen ....31
2.2.4 Oxidative Schädigungsparameter und Folgereaktionen ....36
3 Material und Methoden ....42
3.1 Ziel des Versuches, Versuchsplan und -parameter ....42
3.2 Zusammensetzung und Herstellung der Versuchsdiäten ....43
3.3 Herkunft, Haltung der Versuchstiere, Durchführung der Versuche ....45
3.4 Analytische Methoden ....45
3.4.1 Energie-, Mineral- und Rohnährstoffgehalt der Versuchsdiäten ....45
3.4.2 Selengehalt in den Versuchsdiäten und in der Leber ....46
3.4.3 Aufarbeitung der Organproben ....46
3.4.3.1 Zytoplasmahomogenate .... 46
3.4.3.2 Mitochondrienisolat .... 47
3.4.4 Selenabhängige Enzyme ....47
3.4.4.1 Cytosolische Glutathionperoxidase (cGPx) .... 47
3.4.4.2 Plasmatische Glutathionperoxidase .... 48
3.4.4.3 Thioredoxinreduktase (TrxR) .... 48
3.4.4.4 Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase (PHGPx) .... 50
3.4.5 Zellschutzparameter ....51
3.4.5.1 Gesamtglutathion und oxidiertes Glutathion .... 51
3.4.5.2 Glutathionreduktase .... 52
3.4.5.3 Glutathion-S-Transferasen .... 53
3.4.5.4 $\alpha$-Glutathion-S-Transferasen .... 53
3.4.6 Zellschädigungsparameter ....54
3.4.6.1 Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBA-RS) .... 54
3.4.6.2 Gamma-Glutaminsynthetase .... 55
3.4.6.3 Proteincarbonyle .... 56
3.4.7 Succinatdehydrogenase ....57
3.4.8 Proteinbestimmung ....57

3.4.9 Differenzielle Genexpression in der Leber ... 58
3.4.9.1 Microarray ... 58
3.4.9.2 Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials ... 59
3.4.9.3 Bestimmung der RNA-Qualität durch Agarose-Gelelektrophorese ... 61
3.4.9.4 Desoxyribonuclease I Verdau ... 61
3.4.10 RT-PCR ... 62
3.4.10.1 Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials ... 62
3.4.10.2 Bestimmung der RNA-Qualität durch Agarose-Gelelektrophorese ... 62
3.4.10.3 Reverse Transkription ... 62
3.4.10.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR) ... 63
3.4.10.5 Darstellung der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese ... 65
3.4.10.6 Messung der Optischen Dichte ... 65
3.4.10.7 Optimierung der PCR-Protokolle ... 65
3.4.10.8 Normierung der Rohdaten ... 66
3.4.11 Statistische Methoden ... 66
4 Ergebnisse ... 68
4.1 Energie-, Mineral- und Rohnährstoffgehalt in den Versuchsdiäten ... 68
4.2 Selengehalt in den Versuchsdiäten ... 69
4.3 Futteraufnahme, Lebendmasseentwicklung und Futterverwertung ... 70
4.4 Selengehalt und Selenoenzymaktivität in Blutplasma und Leber ... 72
4.5 Zellschutzparameter in der Leber (Glutathionmetabolismus) ... 74
4.6 Zellschädigungsparameter in der Leber (Lipide, Proteine) ... 75
4.7 Differenzielle Genexpression in der Leber ... 76
4.7.1 Selenoenzyme und Zellschutzparameter ... 76
4.7.2 Weitere exprimierte Gene in der Leber ... 79
5 Diskussion ... 82
5.1 Lebendmasseentwicklung, Futteraufnahme und Futterverwertung ... 82
5.2 Überprüfung des Se-Status anhand der Se-Gehalte in Leber und Plasma 85
5.3 Aktivität und Expression von Selenoenzymen ... 87
5.4 Glutathionmetabolismus und selenunabhängige Glutathion-peroxidase ... 94
5.5 Zellschädigungsparameter (Lipide und Proteine) ... 100
5.6 Differenzielle Genexpression ... 105
6 Schlussfolgerung ... 114
7 Zusammenfassung ... 116
8 Summary ... 119
9 Literaturverzeichnis ... 122
10 Anhang ... 139

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|---|
| 3´UTR | 3´ untranslated region |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| cGPx, GPx-1 | cytosolische Glutathionperoxidase |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DHLA | Dihydroliponsäure |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonukleinase |
| eEFsec/mSelB | Elongationsfaktor Selenocystein |
| FAD | Flavin Adenin Dinukleotid |
| γGS | γ-Glutaminsynthetase |
| GCS | Glutamylcysteinsynthase |
| GIGPx, GPx-2 | gastrointestinale Glutathionperoxidase |
| GR | Glutathionreduktase |
| GS | Glutathionsynthetase |
| GSH | reduziertes Glutathion |
| GSSG | Glutathiondisulfid (oxidiertes Glutathion) |
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| $H_2O_2$ | Wasserstoffperoxid |
| I.E. | internationale Einheiten |
| LM | Lebendmasse |
| LO• | Alkoxylradikal |
| LOO• | Hydroxylperoxylradikale |
| mRNA | messenger RNA |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NMD | nonsense mediated decay |
| nt | Nukleotide |
| $O_2^-$• | Superoxidradiakal |
| $OH^-$ | Hydroxid-Ion |
| p53 | tumor supressor protein 53 |
| PC | Proteincarbonyle |
| PDI | Proteindisulfidisomerase |
| pGPx, eGPx, GPx-3 | plasmatische Glutathionperoxidase |
| PHGPx, GPx-4 | Phospholipidhydroperoxid Glutathionperoxidase |
| ppm | parts per million |
| Prx | Peroxiredoxin |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonukleinase |
| ROH | Alkohole |
| ROOH/LOOH | Lipidhydroperoxide |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies |
| RSSeH/GSSeH | Selenopersulfid |
| RSSeSR | Selenotrisulfid |
| SBP2 | SECIS-binding protein |
| $^{75}Se$ | Selenisotop M=75 |
| Se 0 | Selenmangelgruppe |
| Sec | Selenocystein |
| SECIS | selenocysteine insertion sequence |

| | |
|---|---|
| tRNA | transfer RNA |
| TrxR1 | cytosolische Thioredoxinreduktase |
| TrxR2 | mitochondriale Thioredoxinreduktase |
| U | Unit (1 μmol Sustratumsatz/min) |
| w/v | weight/volume |

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS


| | | |
|---|---|---|
| Abbildung 1: | Intestinale Absorption und Intermediärmetabolismus verschiedener Selenverbindungen | 7 |
| Abbildung 2: | Selenoproteinbiosynthese in Eukaryonten (modifiziert nach KÖHRLE 2005) | 11 |
| Abbildung 3: | Funktionen des Thioredoxin-Systems (NORDBERG und ARNÉR 2001) | 19 |
| Abbildung 4: | Hierarchie der Selenoenzyme (modifiziert nach BRIGELIUS-FLOHÉ 1999 und SUNDE 2001) | 21 |
| Abbildung 5: | Selendosierung und physiologische Reaktionen (modifiziert nach COMBS und GRAY, 1998) | 25 |
| Abbildung 6: | Superoxidradikal-Synthese durch Selenitkatalyse (SEKO et al. 1989) | 29 |
| Abbildung 7: | Sequentielle Reduktion von molekularem Sauerstoff (MARKANT et al. 1995) | 31 |
| Abbildung 8: | Einfluss unterschiedlicher Selenversorgung auf die Selenkonzentration in der Leber und im Plasma der Ratten (Versuch 1 und 2) nach 8-wöchiger Versuchsdauer | 86 |
| Abbildung 9: | Einfluss unterschiedlicher Selenversorgung auf die Aktivität der cGPx (Versuch 1) in der Rattenleber nach 8-wöchiger Versuchsdauer | 88 |
| Abbildung 10: | Einfluss unterschiedlicher Selenversorgung auf die Genexpression der cGPx (Versuch 1) in der Rattenleber nach 8-wöchiger Versuchsdauer | 89 |
| Abbildung 11: | Einfluss unterschiedlicher Selenversorgung auf die Aktivität der PHGPx (Versuch 2) in der Rattenleber nach 8-wöchiger Versuchsdauer | 90 |
| Abbildung 12: | Einfluss unterschiedlicher Selenversorgung auf die Genexpression der PHGPx (Versuch 2) in der Rattenleber nach 8-wöchiger Versuchsdauer | 91 |
| Abbildung 13: | Einfluss unterschiedlicher Selenversorgung auf die Aktivität der TrxR2 (Versuch 1) in der Rattenleber nach 8-wöchiger Versuchsdauer | 92 |
| Abbildung 14: | Einfluss unterschiedlicher Selenversorgung auf die Genexpression der TrxR2 (Versuch 1) in der Rattenleber nach 8-wöchiger Versuchsdauer | 94 |
| Abbildung 15: | Einfluss unterschiedlicher Selenversorgung auf die Aktivität der $\alpha$GST (Versuch 2) in der Rattenleber nach 8-wöchiger Versuchsdauer | 98 |

Abbildung 16: Einfluss unterschiedlicher Selenversorgung auf die Genexpression der αGST A2 (Versuch 2) in der Rattenleber nach 8-wöchiger Versuchsdauer 99

Abbildung 17: Einfluss unterschiedlicher Selenversorgung auf die TBA-RS Konzentration (Versuch 1) in der Rattenleber nach 8-wöchiger Versuchsdauer 102

# TABELLENVERZEICHNIS


| | | |
|---|---|---|
| Tabelle 1: | Auswahl identifizierter Selenoproteine (modifiziert nach RAYMAN 2002, KÖHRLE et al. 2000, BECKETT et al. 2005) | 13 |
| Tabelle 2: | Akute Toxizität verschiedener Selenverbindungen bei der Ratte anhand des $LD_{min}$- und $LD_{50}$-Wertes (modifiziert nach PAINTER 1941, SHIBATA et al. 1992) | 28 |
| Tabelle 3: | Versuchsdesign der beiden Rattenversuche | 42 |
| Tabelle 4: | Versuchsparameter von Versuch 1 und 2 | 43 |
| Tabelle 5: | Zusammensetzung der Basisdiät | 44 |
| Tabelle 6: | Cohybridisierung der Microarrays | 59 |
| Tabelle 7: | Ansatz des Guanidinthiocyanat-Puffers | 59 |
| Tabelle 8: | Primer, Annealingtemperatur und Zyklenzahl | 64 |
| Tabelle 9: | Energie-, Mineral- und Rohnährstoffgehalt der Versuchsdiäten 1 und 2 | 68 |
| Tabelle 10: | Selengehalt der Versuchsdiäten 1 und 2 | 69 |
| Tabelle 11: | Wöchentliche Futteraufnahme, Gesamtfutteraufnahme und Futterverwertung der Ratten in Versuch 1 und 2 | 70 |
| Tabelle 12: | Lebendmasseentwicklung, Gesamtlebendmassezunahme und tägliche Zunahmen der Ratten in Versuch 1 und 2 | 71 |
| Tabelle 13: | Selengehalte und Selenoenzymaktivitäten in Leber und Plasma wachsender Ratten nach 8-wöchiger Versuchsdauer (Versuch 1 und 2) | 73 |
| Tabelle 14: | Zellschutzparameter in der Leber wachsender Ratten nach 8-wöchiger Versuchsdauer (Versuch 1 und 2) | 75 |
| Tabelle 15: | Zellschädigungsparameter in der Leber wachsender Ratten nach 8-wöchiger Versuchsdauer (Versuch 1) | 76 |
| Tabelle 16: | Genexpression der cGPx ermittelt durch Microarray-Screening und RT-PCR in Versuch 1 und 2 | 77 |
| Tabelle 17: | Genexpression der PHGPx ermittelt durch Microarray-Screening und RT-PCR in Versuch 1 und 2 | 77 |
| Tabelle 18: | Genexpression der TrxR1 ermittelt durch Microarray-Screening und RT-PCR in Versuch 1 und 2 | 78 |
| Tabelle 19: | Genexpression der TrxR2 ermittelt durch Microarray-Screening und RT-PCR in Versuch 1 und 2 | 78 |

| | | |
|---|---|---|
| Tabelle 20: | Genexpression der GST A2 ermittelt durch Microarray-Screening und RT-PCR in Versuch 1 und 2 | 79 |
| Tabelle 21: | Genexpression ausgewählter Gene aus dem Gebiet der zellulären Detoxifikation und des Xenobioticametabolismus ermittelt durch Microarray-Screening in Versuch 1 | 79 |
| Tabelle 22 | Genexpression ausgewählter Gene aus den Gebieten Zellzyklus, Apoptose und Krebs ermittelt durch Microarray-Screening in Versuch 1 | 80 |
| Tabelle A1a: | Wöchentliche Futteraufnahme, Gesamtfutteraufnahme, Futterverwertung in Versuch 1 | 139 |
| Tabelle A1b: | Wöchentliche Futteraufnahme, Gesamtfutteraufnahme, Futterverwertung in Versuch 1 | 140 |
| Tabelle A1c: | Wöchentliche Futteraufnahme, Gesamtfutteraufnahme, Futterverwertung in Versuch 1 | 141 |
| Tabelle A2a: | Wöchentliche Lebendmasseentwicklung, Gesamt-lebendmassezunahmen, tägliche Zunahmen in Versuch 1 | 142 |
| Tabelle A2b: | Wöchentliche Lebendmasseentwicklung, Gesamt-lebendmassezunahmen, tägliche Zunahmen in Versuch 1 | 143 |
| Tabelle A2c: | Wöchentliche Lebendmasseentwicklung, Gesamt-lebendmassezunahmen, tägliche Zunahmen in Versuch 1 | 144 |
| Tabelle A3a: | Wöchentliche Futteraufnahme, Gesamtfutteraufnahme, Futterverwertung in Versuch 2 | 145 |
| Tabelle A3b: | Wöchentliche Futteraufnahme, Gesamtfutteraufnahme, Futterverwertung in Versuch 2 | 146 |
| Tabelle A4a: | Wöchentliche Lebendmasseentwicklung, Gesamt-lebendmassezunahmen, tägliche Zunahmen in Versuch 2 | 147 |
| Tabelle A4b: | Wöchentliche Lebendmasseentwicklung, Gesamt-lebendmassezunahmen, tägliche Zunahmen in Versuch 2 | 148 |
| Tabelle A5a: | Selengehalte und Selenoenzymaktivitäten in Leber und Plasma von Versuch 1 | 149 |
| Tabelle A5b: | Selengehalte und Selenoenzymaktivitäten in Leber und Plasma von Versuch 1 | 150 |
| Tabelle A5c: | Selengehalte und Selenoenzymaktivitäten in Leber und Plasma von Versuch 1 | 151 |
| Tabelle A6a: | Selengehalte und Selenoenzymaktivitäten in Leber und Plasma von Versuch 2 | 152 |
| Tabelle A6b: | Selengehalte und Selenoenzymaktivitäten in Leber und Plasma von Versuch 2 | 153 |
| Tabelle A7a: | Zellschutzparameter in der Leber von Versuch 1 | 154 |
| Tabelle A7b: | Zellschutzparameter in der Leber von Versuch 1 | 155 |
| Tabelle A7c: | Zellschutzparameter in der Leber von Versuch 1 | 156 |

| | | |
|---|---|---|
| Tabelle A8a: | Zellschutzparameter in der Leber von Versuch 2 | 157 |
| Tabelle A8b: | Zellschutzparameter in der Leber von Versuch 2 | 158 |
| Tabelle A9a: | Zellschädigungsparameter in der Leber von Versuch 1 | 159 |
| Tabelle A9b: | Zellschädigungsparameter in der Leber von Versuch 1 | 160 |
| Tabelle A9c: | Zellschädigungsparameter in der Leber von Versuch 1 | 161 |
| Tabelle A10: | Genexpression der αGST A5, γ-Glutamylcysteinsynthetase und γ-Glutamyltranspeptidase ermittelt durch Microarray-Screening in Versuch 1 | 161 |

# 1 Einleitung

Mit der Entdeckung des Faktors 3 durch SCHWARTZ und FOLTZ gelang es 1957 erstmals, dem Element Selen, dem bisher nur eine toxische Wirkung zugeschrieben wurde, eine biologische Rolle als „Leberschutzfaktor“ zuzuordnen. Der Startschuss für die Selenforschung fiel jedoch erst 1973 mit der Entdeckung von Selen als integraler Komponente des Enzyms Glutathionperoxidase durch ROTRUCK et al. und FLOHÉ et al. Seither konnte Selenoproteinen eine Funktion bei der Regulation des Redoxgleichgewichts, des Hormonhaushaltes sowie als Strukturprotein nachgewiesen werden.

Das Ziel der meisten Untersuchungen zur Selensupplementierung war es, den individuellen Selenbedarf abzuleiten und so der Entstehung von Fruchtbarkeitsstörungen, embryonalem Fruchttod, Kümmern, Leistungsabfall und einer erhöhten Anfälligkeit für Krankheiten vorzubeugen. Weiter gelang es, schon lange bekannte Krankheiten wie die nutritive Muskeldystrophie und die Maulbeerherzkrankheit bei landwirtschaftlichen Nutztieren sowie die Keshan Krankheit und Kashin-Beck Krankheit beim Menschen auf einen klinisch manifesten Selenmangel zurückzuführen.

In den letzten Jahren rückten die möglichen positiven Effekte von supranutritiven Selengaben, d.h. von Selenaufnahmen oberhalb der empfohlenen Tagesdosis, die jedoch noch keine Toxizität auslösen, in den Mittelpunkt des Interesses. Solche Selendosierungen führen zu einer erhöhten Akkumulation von Selen im Gewebe und zu einer vermehrten Produktion von aktiven methylierten Zwischenprodukten des Selenstoffwechsels. Ihnen konnte bis heute eine Wirkung z.B. bei verschiedenen Krebserkrankungen nachgewiesen werden (COMBS und COMBS 1986, IP 1998).

In Deutschland (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch 2005, Futtermittelverordnung 2005) sind nur die zwei anorganischen Selenverbindungen Natriumselenat und Natriumselenit als Zusatzstoffe in der Tierernährung zugelassen. Bereits in den 80er und 90er Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, die die unterschiedlichen Absorptionsmechanismen dieser beiden Selenverbindungen aus dem Gastrointestinaltrakt belegen. Dies ist auf chemische Unterschiede von Selenit (+IV) und Selenat (+VI) zurückzuführen. Die einzelnen Schritte der Metabolisierung nach Aufnahme in die Enterozyten sind bis heute jedoch noch nicht genau geklärt. Die bisherigen Ergebnisse deuten aber Unterschiede im

Stoffwechsel der beiden Verbindungen an. Letztlich könnten hieraus auch Auswirkungen auf die differenzielle Genexpression resultieren.

In den überarbeiteten synthetischen Diäten des American Institute of Nutrition (AIN), die in den Fütterungsempfehlungen des National Research Council (NRC) für Labortiere niedergelegt sind, wurde Natriumselenit bereits 1993 durch Natriumselenat ersetzt (REEVES 1997). Weltweit kann daher in den letzen Jahren zunehmend der Einsatz von Natriumselenat in Studien beobachtet werden.

Grundlegende Untersuchungen zur Vergleichbarkeit von Versuchsreihen auf Basis von Natriumselenit mit Versuchen auf Basis von Natriumselenat liegen bisher kaum vor.

In der vorliegenden Arbeit soll daher die Wirkung der anorganischen Selenverbindungen Natriumselenit und Natriumselenat in Dosierungen gemäß der Empfehlung und in zwei supranutritiven Dosierungen im Vergleich zu einer Selenmangelgruppe untersucht werden. Hierbei soll die Wirkung von Natriumselenit der von Natriumselenat direkt gegenübergestellt werden. Mit Hilfe eines Microarray-Screenings soll weiter der Effekt dieser anorganischen Selenverbindungen auf die differenzielle Genexpression allgemein erfasst und spezifische Parameter der Selenversorgung auf Ebene der Genexpression und der Proteine eingehend untersucht werden. Vergleichende Analysen über den Schutz vor Lipid- und Proteinoxidation sollen weitere Aspekte der Wirksamkeit von Selenit und Selenat darstellen.

# 2 Literaturübersicht

## 2.1 Selen

### 2.1.1 Geschichte

Das Element Selen wurde erstmals im Jahre 1817 von dem schwedischen Chemiker Jons Jacob BERZELIUS beschrieben. In einer Anlage zur Herstellung von Schwefelsäure nach dem Bleikammerverfahren entdeckte er in einer Bleikammer Selen als einen roten Niederschlag. Berzelius nannte das neue Element Selen (gr. Selene: Mondgöttin), um die chemische Verwandtschaft von Selen zu Tellur (lat. tellus: Erde) zu unterstreichen.

Selen ist das Spurenelement mit der geringsten therapeutischen Breite und galt deshalb lange als ein toxisches Element. Bereits Marco POLO beschrieb im Jahre 1295 bei einer Reise entlang der Seidenstraße ein Krankheitsbild, das heute auf die toxische Wirkung von Selen zurückgeführt werden kann. Schließlich wurde eine chronische Selenvergiftung auch als Ursache für das Auftreten der so genannten „alkali disease“ im mittleren Westen der USA identifiziert (FRANKE 1934, WILBER 1980).

Selen fand zunehmendes Interesse, nachdem SCHWARZ und FOLTZ im Jahr 1957 die Essentialität von Selen für Säugetiere nachweisen konnten. Die Entdeckung von Selen als integrale Komponente des Enzyms Glutathionperoxidase durch ROTRUCK et al. (1973) und FLOHÉ et al. (1973) stellte 15 Jahre später den Beginn der biochemischen Selenforschung dar.

Bis zum heutigen Tage konnten vier Familien von Selenoenzymen identifiziert und charakterisiert werden. Hierbei handelt es sich um Glutathionperoxidasen, Deiodinasen, Thioredoxinreduktasen und eine Selenophosphatsynthetase. Es folgte der Nachweis sechs weiterer Selenoproteine (KRYUKOV et al. 1999, LESCURE et al. 1999). Dass eine große Anzahl Se-haltiger Proteine bis heute noch nicht näher identifiziert sind, konnte jedoch in einem Experiment mit Ratten, denen $^{75}Se$ verabreicht wurde, nachgewiesen werden (BEHNE et al. 1996).

### 2.1.2 Allgemeine chemische und physikalische Eigenschaften von Selen

Das Element Selen (MG = 78,96), das elementar als amorphes Pulver oder in kristalliner Struktur vorkommt, bildet zusammen mit Sauerstoff, Schwefel, Tellur und Polonium die Gruppe VIa im Periodensystem der Elemente. Selen weist ähnliche chemische und physikalische Eigenschaften wie Schwefel auf und wird im Allgemeinen als Selenid in sulfidischen Erzen gefunden. Die beiden Elemente besitzen, verglichen mit den anderen Elementen der Gruppe ähnliche Atomdurchmesser, Bindungs- und Ionisierungsenergien sowie eine vergleichbare Elektronenaffinität. Im Gegensatz zu Schwefel besitzt Selen (-0,40) aber ein stärkeres Redoxpotential als Schwefel (+0,14) für die Bildung von $H_2X$ in saurer Lösung (COTTON und WILKINSON 1967, BROWN und MAY 1988). Dies kann durch die Reaktion der vierwertigen Kationen beider Elemente dargestellt werden. Während Selendioxid als Oxidationsmittel fungiert, reagiert Schwefeldioxid als Reduktionsmittel. Des Weiteren besitzen Schwefel und Selen unterschiedliche Säurestärken. Hierbei bilden Selenwasserstoffverbindungen ($H_2Se \rightarrow HSe^-$; $pK_a$ 3,73) stärkere Säuren aus als die analogen Schwefelverbindungen ($H_2S \rightarrow HS^-$; $pK_a$ 6,93). (FOSTER und SUMAR 1997).

Diese Eigenschaften sind entscheidend für die katalytische Aktivität von Selenoproteinen, in deren Zentrum sich ein Selenocysteinrest befindet. Unter physiologischen pH-Bedingungen liegt Selen im Gegensatz zu Schwefel dissoziiert als Selenolat-Anion vor (STADTMAN 1996). Die Ionisation und der größere Atomradius von Selen im Vergleich zu Schwefel machen ein Selenol zu einem stärkeren Nukleophil als ein Thiol (HUBER und CRIDDLE 1967). Der Ersatz von Selen durch Schwefel in Selenoenzymen führt daher zu einem deutlichen Rückgang der Enzymaktivität (ROCHER et al. 1992). Die Toxizität von Selen wird ebenfalls auf Reaktionen von Selen- und Schwefelverbindungen zurückgeführt. Hierbei reagieren u.a. Selenite oder Selendioxid mit Thiolen (z.B. Glutathion, Selenocystin) zu elementarem Selen und führen gleichzeitig zu der Bildung von Superoxidradikalen (SPALLHOLZ 1994).

Selen kann die Oxidationsstufen von -II (Selenide), +IV (Selenite) bis +VI (Selenate) annehmen. Die Metallselenide mit der Oxidationszahl -II und elementares Selen sind in Wasser schwerlöslich, während Alkaliselenite (+IV) und Alkaliselenate (+VI) in Wasser löslich sind. Deshalb weisen sie eine bessere Bioverfügbarkeit für Pflanzen und Tiere auf (BARCELOUX 1999). Bei der Aminosäurensynthese in Pflanzen und Tieren wird Selen anstelle des Schwefels in die Aminosäuren Cystein und Methionin

eingebaut Daher können anorganische, wasserlösliche Selenverbindungen neben Selenoaminosäuren zur Deckung des Selenbedarfes beitragen (WOLFFRAM 2000).

### 2.1.3 Selenhomöostase

*Absorption*

Die Absorptionsmechanismen und die damit einhergehende Bioverfügbarkeit organischer und anorganischer Selenverbindungen rückten in den letzten Jahrzehnten in den Mittelpunkt zahlreicher Untersuchungen. Bilanzstudien konnten zeigen, dass Selenoaminosäuren sowie Selenit und Selenat effizient aus dem Gastrointestinaltrakt absorbiert werden (WOLFFRAM et al. 1985,1989; MYKKANEN und WASSERMAN 1989, VENDELAND et al. 1992a).

In *in vivo* Experimenten konnte die Höhe der Selenabsorption in verschiedenen Darmabschnitten ermittelt und das Ileum als Ort mit der höchsten Absorptionsrate identifiziert werden (ARDÜSER et al. 1985 und WOLFFRAM et al. 1985). Die an der Absorption beteiligten Mechanismen variieren hierbei in Abhängigkeit von der Selenverbindung jedoch stark.

1985 stellten ARDÜSER et al. eine durch Na-Ionen stimulierte Absorption von Selenat in der Bürstensaumregion des Ileums fest (Abb. 1). Experimente mit isolierten Bürstensaumvesikeln konnten den aktiven Selenattransport-Mechanismus genauer definieren. So wird Selenat im Gegensatz zu Selenit mittels eines Natrium-Cotransportes über denselben Mechanismus wie Sulfat durch den Bürstensaum transportiert (WOLFFRAM et al. 1985, 1986, 1988). TURNER et al. (1990) und ARDÜSER et al. (1985) konnten in Darmsäckchen des Ileums die Absorption von Selenat aus dem Darmlumen durch die Anwesenheit von Oxyanionen (Sulfat, Thiosulfat) und Ouabain (Na/K ATPase-Hemmer) inhibieren und somit die Abhängigkeit von einer $Na^+$-ATPase bestätigen. Des Weiteren können Selenat und Sulfat bei vorliegendem Na-Ionengefälle einen weiteren Transportmechanismus nutzen. Hierbei handelt es sich um einen Austausch von Selenat (Sulfat) gegen intrazelluläre Hydroxyanionen (WOLFFRAM et al. 1988).

Selenit weist eine signifikant niedrigere Absorptionsrate als Selenat auf, da es intestinal durch passive Diffusion absorbiert wird (ARDÜSER et al. 1985, WOLFFRAM et al. 1986, MYKKANEN und WASSERMAN 1989). MYKKANEN und WASSERMAN (1990) konnten bei der Inkubation von isolierten Bürstensaummembranvesikeln in einem selenit($^{75}$Se)haltigen Medium eine starke Anreicherung von Selenbindungen

an der Oberfläche der Darmwand beobachten, in deren Anschluss vermutlich die Aufnahme von Selenit mittels Diffusion steht. Diese Beobachtung führten sie auf die Reaktion von Selenit mit membranständigen Thiolgruppen zurück (WOLFFRAM et al. 1986, MYKKANEN und WASSERMAN 1989). Des Weiteren wird die Absorption von Selenit durch intra- und extrazelluläre Thiole beeinflusst. So konnte eine zunehmende Akkumulation von Selenit und eine rasche Abnahme des intrazellulär vorliegenden Glutathions (GSH) in den Dünndarmenterozyten der Ratte, die in einem selenithaltigen Medium inkubiert worden waren, beobachtet werden, wenn die Konzentration intrazellulären Glutathions anstieg (ANUNDI et al. 1984). Die intrazelluläre Reaktion von Selenit mit Glutathion zu (beispielsweise) Selenodiglutathion dient vermutlich der Aufrechterhaltung eines selenitabhängigen Konzentrationsgefälles (ANUNDI et al. 1984, MYKKANEN und WASSERMAN 1989).

Neben den intrazellulären Thiolen können auch extrazelluläre Thiole im Darmlumen die Absorption von Selenit beeinflussen. Die Aufnahme von cysteinhaltigen Proteinen und Glutathion mit der Nahrung bzw. die Sekretion von Glutathion über die Galle stimuliert die Aufnahme von Selenit aus dem Dünndarm. Selenit wird in Anwesenheit von Thiolen zu Selenotrisulfiden (RSSeSR), Selenopersulfiden (RSSeH), Selenid und elementaren Selen reduziert (GANTHER 1968 und 1971). Die Aufnahme dieser Verbindungen aus dem Darm könnte neben der passiven Diffusion zu der Absorption von Selen aus Selenit beitragen (SCHARRER et al. 1992, SENN et al. 1992, VENDELAND et al. 1992b). Die Selenaufnahme aus Selenit, die cysteinstimuliert war, zeigte eine klare Na-Abhängigkeit und wurde durch L-Leucin und L-Glutaminsäure gehemmt. WÜRMLI et al. (1989), SCHARRER et al. (1992) und SENN et al. (1992) schlossen daraus, dass aminosäureähnliche Reaktionsprodukte entstehen (Selenodicystein, Selenocysteinpersulfid), die $Na^+$-abhängig über Aminosäure-Carrier durch die Bürstensaummembran transportiert werden. Der positive Einfluss von Glutathion und D-Cystein auf die gastrointestinale Selenitabsorption könnte des Weiteren durch das Reduktionsprodukt Selenid zustande kommen, welches eine hohe intestinale Absorptionsrate aufweist (SCHARRER et al. 1992, SENN et al. 1992). Bei einer weiteren Untersuchung konnte die Akkumulation des Selens an der Mukosa des Ileums in einem glutathionhaltigen Medium angeregt werden (ARDÜSER et al. 1986).

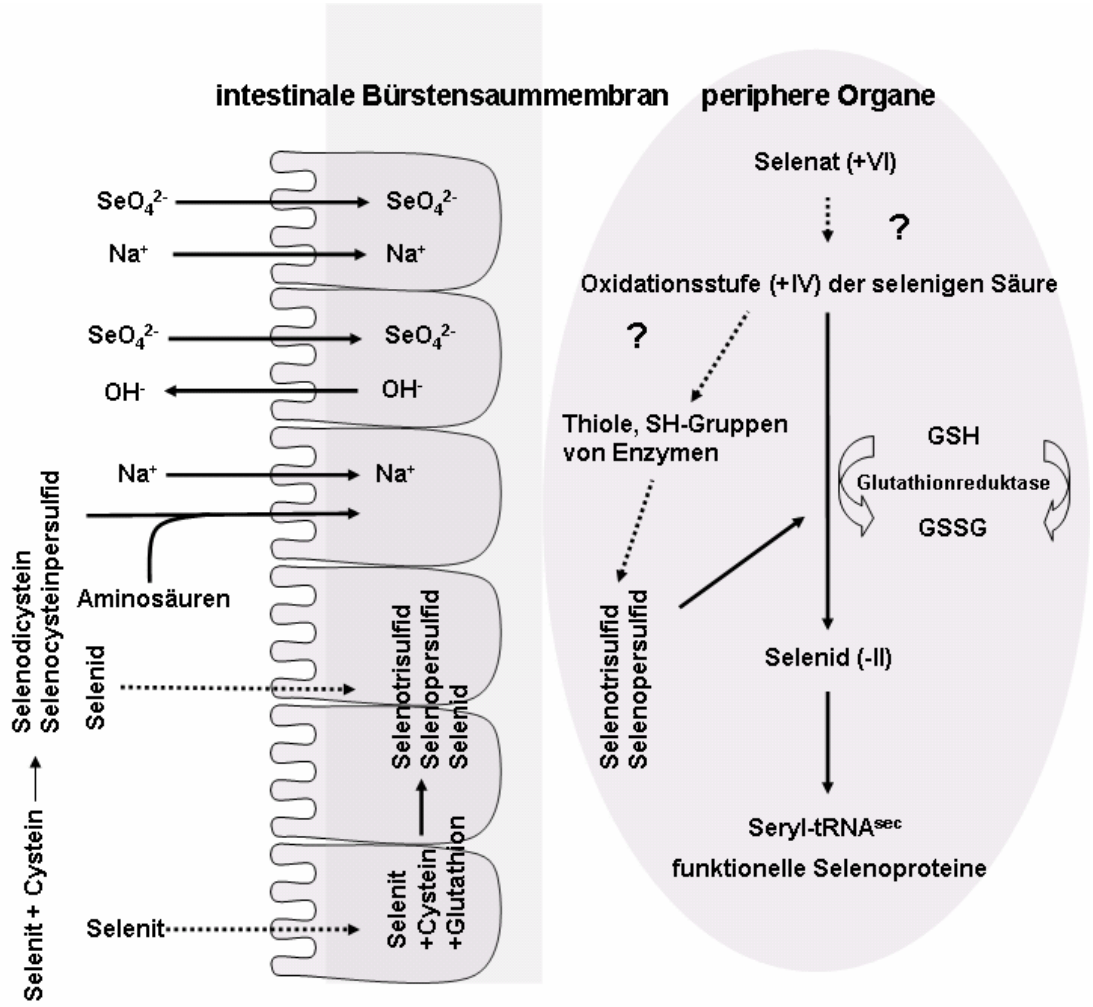



***Abbildung 1**: Intestinale Absorption und Intermediärmetabolismus verschiedener Selenverbindungen*

Selenoaminosäuren, wie Selenomethionin, Selenocystein und Selenocystin bilden die Selenquellen aus pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln. Untersuchungen von WOLFFRAM et al. (1989) an der Bürstensaummembran des Schweins konnten zeigen, dass Selenomethionin über den gleichen $Na^+$ Ionen-abhängigen Aminosäure-Carrier wie Methionin transportiert wird. Selenocystein und Cystein hingegen werden über den Carrier für basische Aminosäuren transportiert. Dies konnte durch die antagonistische Wirkung von Arginin, Lysin und Se-Cystein auf Cystein bestätigt werden.

*Metabolismus*

Die Darmepithelzellen geben die absorbierten Selenverbindungen und die intrazellulär entstandenen Zwischenprodukte an das Blut ab. Die zugrunde liegenden Selenverbindungen und Mechanismen sind noch weitestgehend unbekannt.

Einige Arbeitsgruppen untersuchten jedoch Metabolite des Selens nach der intravenösen Verabreichung anorganischer Selenverbindungen bei Ratten und konnten zeigen, dass diese im Blutkreislauf unterschiedlich metabolisiert werden (SUZUKI et al. 1997, 1998; SHIOBARA et al. 1999). Selenit wird rasch und selektiv mittels eines Anionenaustausch-Carriers von den Erythrozyten (RBC) aufgenommen. In den RBC wird Selenit durch GSH zu Selenid (-II) reduziert und in das Blutplasma abgegeben. Im Blutplasma reagiert Selenid in erster Linie mit Albumin, vermutlich durch S-Se-Brückenbildung, und wird in Form dieses Komplexes zur Leber transportiert (SANDHOLM 1973, SUZUKI et al. 1997). Eine direkte Abgabe von Selenid aus den Erytrocyten an die Leber ist nicht möglich, weil die Abgabe an die Anwesenheit von Albumin (Plasma) gekoppelt ist (SUZUKI et al. 1997, 1998).

SHIOBARA et al. (1999) untersuchten die Bildung von Metaboliten im Blut der Ratten nach einer intravenösen Verabreichung von Selenat. Im Gegensatz zu Selenit interagiert Selenat nicht mit RBCs, sondern wird direkt zur Leber transportiert. Obwohl Selenat nicht im Blut reduziert wird, konnten bei der Untersuchung des Urins von Selenit- und Selenat-behandelten Tieren identische Metabolite identifiziert werden, welche durch Reduktions- und Methylierungsreaktionen entstehen. Dies deutet darauf hin, dass die Reduktion von Selenat zu Selenid beim Transfer in die Leber bzw. in der Leber selbst stattfindet.

Die Stoffwechselwege anorganischer und organischer Selenverbindungen im Blut sind von Bedeutung, da die Versorgung der Gewebe mit Selen für die Biosynthese von Selenoproteinen über den Blutkreislauf erfolgt.

Hierbei beeinflusst die aufgenommene Selenverbindung die Gewebeakkumulation und den intermediären Metabolismus von Selen direkt. Während anorganische und organische Selenverbindungen bei einer adäquaten Methioninversorgung im gleichen Maße für die Synthese von Selenoenzymen (GPx) zur Verfügung stehen, kann Se-Methionin analog zu S-Methionin unspezifisch in andere Proteine eingebaut werden (BEILSTEIN und WHANGER 1986a, 1986b; BEHNE et al. 1991, MAHAN et al. 1999). Bei der Applikation hoher Dosen von Selenomethionin bzw. bei einer marginalen Methioninversorgung kann ein vermehrter unspezifischer Einbau von Se-Methionin in Proteine beobachtet werden (WASCHULEWSKI und SUNDE 1988, BUTLER et al. 1989). Selenocystein wird ebenfalls analog der selenhaltigen Aminosäure Cystein in unspezifische Proteine eingebaut. Obwohl spezifische Seleno-

proteine Selenocystein enthalten, kann das aus der Nahrung stammende Selenocystein nicht direkt in diese eingebaut werden (DANIELS 1996).

JANGHORBANI et al. (1990) postulierten die Existenz von zwei Selen-Pools im Stoffwechsel des tierischen Organismus. Der erste Pool wird als „austauschbarer metabolischer Pool“ bezeichnet. Er beinhaltet alle Zwischenprodukte, die bei der Reduktion von Selenat zu Selenid entstehen: Methylierungsprodukte z.B. Methylselenol, Dimethylselenid und Trimethylselenonium sowie alle endogen synthetisierten Selenoproteine (JANGHORBANI et al. 1990, WOLFFRAM 2000). Der zweite Selen-Pool beinhaltet selenomethioninhaltige Proteine, denen im Sinne einer biologischen Wirkung keine Funktion zukommt. Pool 2 kann jedoch, ähnlich wie Ferritin für Eisen, eine Funktion als Selenspeicher zugesprochen werden (JANGHORBANI et al. 1990). Selenomethionin wird, entsprechend dem Abbau von Methionin, durch „Transselenierung“ zu Selenocystein metabolisiert. Selenocystein wird im Organismus durch die Selenocystein-β-Lyase in der Leber abgebaut. Elementares Selen wird freigesetzt und sofort zu Selenid reduziert (ESAKI et al. 1982, SUNDE 1990). Ein zweiter möglicher Stoffwechselweg bei Tieren ist die Freisetzung von Methylselenol aus Selenomethionin durch eine L-Met-γ-Lyase (ESAKI et al. 1979). Das entstehende Methylselenol kann durch Methylierung in Form von Dimethylselenid oder Trimethylselenonium renal ausgeschieden werden oder als Selenid der Synthese von Selenoproteinen zur Verfügung stehen (NAKAMURO et al. 2000). Die anorganische Selenverbindung Selenat wird glutathionabhängig zu Selenit reduziert. Selenit wird anschließend zu Selendiglutathion und dieses wiederum durch NADPH-abhängige Reduktasen zu Selenid reduziert (GANTHER 1971). Selenid spielt eine zentrale Rolle im Selenstoffwechsel. Es steht im Zusammenhang mit dem Einbau von Selen in spezifische Selenoproteine und der Ausscheidung von Selen in methylierter Form.

*Exkretion*

Selenmetabolite können in Faeces, Urin und Lunge nachgewiesen werden. Der Selengehalt in den Faeces spielt hier im Sinne einer homöostatischen Regulation keine Rolle. Vielmehr stellt der Selengehalt des Kotes einen Parameter für die Absorption der Selenverbindung aus dem Magen-Darm-Trakt dar. Der wichtigste Ausscheidungsweg ist die homöostatische Exkretion über den Urin gefolgt von der Exkretion über die Lunge bei der Aufnahme toxischer Selenkonzentrationen (DANIELS,

1996). Die Ausscheidung von Selen über den Urin bzw. über die Lunge erfolgt nach Metabolisierung in Form von methylierten Selenverbindungen.
OGRA et al. konnten 2002 den Se-Metaboliten mit dem höchsten Anteil im Urin identifizieren, es handelt sich dabei um einen Selenozucker (Se-Methyl-N-Acetyl-galactosamin; Selenozucker B). In der Leber konnte die Vorstufe von Selenozucker B identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um Selenozucker A (Se-Glutathionyl-N-Acetylgalactosamin), welcher bei der Reaktion von Selenopersulfiden (GSSeH) mit einem Zuckerrest entsteht. Selenozucker A wird intrazellulär methyliert und der entstehende Selenozucker B gelangt über den Blutkreislauf in den Urin (KOBAYASHI et al. 2002, SUZUKI et al. 2005).
Dimethylselenid und Trimethylselenonium entstehen nach der Methylierung von Selenid bzw. nach der Umsetzung von Se-Methionin mit Methionin-$\gamma$–Lyase zu Methylselenol. Methylselenol wird zweifach methyliert. Es entsteht Dimethylselenid, welches ausgeatmet wird und das Trimethylselenonium-Ion, das über den Urin abgegeben wird (HSIEH und GANTHER 1977, SUNDE 1990, NAKAMURO et al. 2000).

### 2.1.4 Biosynthese von Selenoproteinen

Die Synthese von Selenocystein in Prokaryonten konnte von BÖCK et al. (1991) weitestgehend aufgeklärt werden. Bei Eukaryonten ist der Mechanismus auch heute teilweise noch ungeklärt.
Spezifische Selenoproteine enthalten in ihrem aktiven Zentrum Selenocystein. Das benötigte Selenocystein entstammt hierbei nicht der Nahrung, sondern wird bei der Synthese von Peptidketten cotranslational hergestellt.
Bei der Biosynthese von Selenoproteinen (Abb. 2) wird zunächst mit Hilfe der Seryl-tRNA-Synthetase eine spezielle tRNA ($tRNA^{sec}$) mit Serin beladen (LEE et al. 1989, MIZUTANI 1989). Die folgende Reaktion von Seryl-$tRNA^{sec}$ mit Selenophosphat, dem Selendonator, wird durch eine Selenocysteinsynthase (SELA) katalysiert. Hierbei wird die Seryl-$tRNA^{sec}$ zu Selenocysteinyl-$tRNA^{sec}$ umgewandelt (MITUZANI et al. 1991, 1992). Als Selenquelle für die Synthese von Selenophosphat dient das im Körper metabolisierte Selenid, welches durch zwei Selenophosphatsynthetasen (SPS1 und SPS2) unter ATP-Verbrauch zu Selenophosphat synthetisiert wird (LOW et al. 1995, GUIMARAES et al. 1996).

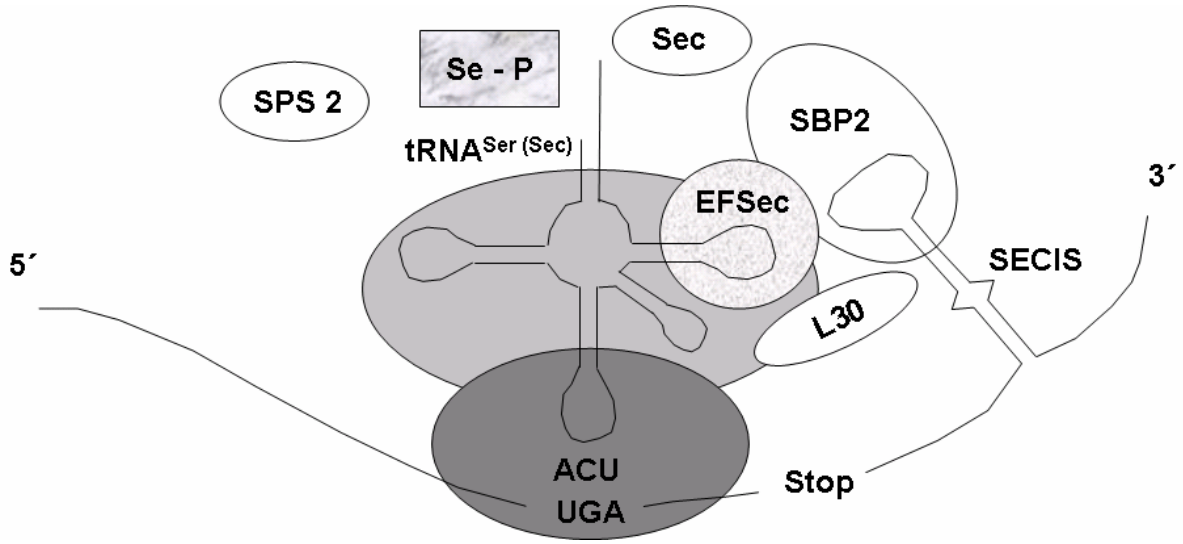



***Abbildung 2:*** *Selenoproteinbiosynthese in Eukaryonten (modifiziert nach KÖHRLE 2005)*

Bei dem Selenocystein-kodierenden Triplet handelt es sich um die Sequenz UGA, die normalerweise die Funktion eines Stop-Codons übernimmt. Die spezielle Selenocysteinyl-tRNA$^{sec}$ ermöglicht jedoch neben der Synthese von Selenocystein die Entschlüsselung des Stop-Codons der mRNA und somit den Einbau von Selenocystein in Selenoproteine (LEE et al. 1989). Der Einbau von Selenocystein (Sec) ist von Sekundärstrukturen der mRNA abhängig. Um UGA von einem Stop-Codon zu einem Selenocystein-Codon zu rekodieren, wird eine spezifische Stammschleifenstruktur, die SECIS (selenocysteine insertion sequence), benötigt. Diese RNA-Struktur, die ein „kink-turn motif" enthält, das mit der Proteinerkennung in Verbindung gebracht wird (CHAVATTE et al. 2005), befindet sich bei Eukaryonten in der untranslierten 3´Region der mRNA mit einer Entfernung von ca. 500 bis 5300 Nukleotiden zu dem UGA-Codon (BERRY et al. 1991). SECIS geht eine stabilisierende Bindung mit einem SECIS-bindenden Protein (SBP2) ein (COPELAND et al. 2000). Diese Sekundärstruktur wird von einem Elongationsfaktor (eEFsec/mSelB) erkannt, der mit der Selenocystetyl-tRNA$^{sec}$ interagiert (FAGEGALTIER et al. 2000, TUJEBAJEVA et al. 2000).

Aus der Entdeckung, dass das ribosomale Protein L30 eine SECIS-Bindung eingeht und unter spezifischen Bedingungen ($Mg^{2+}$-Konzentrationen und Bindungskonkurrenz), welche mit einer Konformationsänderung am „kink-turn motif" einhergehen, SBP2 ersetzt, schlossen CHAVATTE et al. (2005), dass SECIS als molekularer Schalter fungiert und postulierten die folgende Erweiterung des Models für die UGA Rekodierung: L30 könnte als Anker im Ribosom fungieren. Sobald der

SBP2-Komplex mit dem Ribosom assoziiert wird könnte SBP2 durch L30 ersetzt werden und SECIS am Ribosom korrekt platzieren. Die induzierte Konformationsänderung des SECIS-Elements wiederum könnte eEFsec die Freigabe von Selenocystetyl-tRNA$^{sec}$ signalisieren und die Polypeptidkette würde um die Aminosäure Selenocystein verlängert werden. Unklar bleibt jedoch wie der mit tRNA$^{sec}$ beladene SECIS-Komplex bei einer Entfernung von bis zu 5000 Nukleotiden das Ribosom lokalisiert.

GELPI et al. (1992) und DING et al. (1999) konnten zwei weitere Proteine im tRNA$^{sec}$-Komplex identifizieren. Hierbei handelt es sich um Secp43 und SLA (soluble liver antigen). Die Funktion dieser Proteine jedoch blieb bislang unklar. 2005 konnten XU et al. durch Knockdown-Experimente mit Zelllinien eine Funktion bei der Biosynthese von Selenoproteinen nachweisen. Diese Faktoren interagieren mit tRNA$^{sec}$ und bilden einen Teil des tRNA$^{sec}$-Komplexes. Des Weiteren spielt Secp43 offenbar eine direkte Rolle bei der Biosynthese, da es an der Methylierung der tRNA$^{sec}$ und an der intrazellulären Verteilung von SLA beteiligt ist.

### 2.1.5 Selenoproteine

Das erste Selenoprotein wurde 1973 durch ROTRUCK et al. (1973) und FLOHÉ et al. (1973) entdeckt. Seither wurden zahlreiche weitere Selenoproteine gefunden. Es handelt sich dabei um enzymatische Selenoproteine und um Selenoproteine mit einer Transport- oder Strukturfunktion (URSINI et al. 1999, HILL und BURK 2001). Bis zum heutigen Tage konnten vier verschiedene Selenoenzymfamilien identifiziert und charakterisiert werden (Tab. 1). Hierbei handelt es sich um Glutathionperoxidasen, Deiodinasen, Thioredoxinreduktasen und eine Selenophosphatsynthetase. Die Expression sechs weiterer Selenoproteine konnte ebenfalls nachgewiesen werden (KRYUKOV et al. 1999, LESCURE et al. 1999).

Dass eine große Anzahl Se-haltiger Proteine bis heute noch nicht näher identifiziert sind, konnte jedoch in einem Experiment mit Ratten, denen $^{75}$Se verabreicht wurde, nachgewiesen werden (BEHNE et al. 1996).

***Tabelle 1:*** *Auswahl identifizierter Selenoproteine (modifiziert nach RAYMAN 2002, KÖHRLE et al. 2000, BECKETT und ARTHUR 2005)*

| Selenoprotein | Abkürzung | Funktion |
|---|---|---|
| Glutathionperoxidasen | | |
| Cytosolische oder klassische GPx | cGPx, GPx-1 | Antioxidanzien, die $H_2O_2$, Phospholipid- und Lipid-hydroperoxide entgiften; daher Schutz von Lipiden, Lipoproteinen und DNA vor oxidativer Schädigung und Einfluss auf Entzündungsgeschehen, PHGPx hat des weiteren Funktion als Strukturprotein in Spermien |
| Phospholipid Hydroperoxid GPx | PHGPx, GPx-4 | |
| Plasmatische GPx | pGPx, GPx-3 | |
| Gastrointestinale GPx | GIGPx, GPx-2 | |
| Iodothyronin Deiodinasen | | |
| 5´Deiodenase, Typ I | 5´DI | Umwandlung von $T_4$ zu bioaktivem $T_3$; Umwandlung von $T_4$ zu bioinaktivem reversen $T_3$ |
| 5´Deiodenase, Typ II | 5´DII | Umwandlung von $T_4$ zu bioaktivem $T_3$ |
| 5´Deiodenase Typ III | 5´DIII | Umwandlung von $T_4$ zu bioinaktivem reversen $T_3$ |
| Thioredoxinreduktasen | | |
| Cytosolische Thioredoxinreduktase | TrxR1 | Reduktion von Nukleotiden bei der DNA-Synthese, Regulation des antioxidativen Systems, Regulation der Genexpression durch Beibehaltung des Redox-Status von Transkriptionsfaktoren, Kontrolle von Zellwachstum, Apoptose |
| Mitochondriale Thioredoxinreduktase | TrxR2 | |
| Testikuläre Thioredoxinreduktase | TrxR3 | |
| Selenophosphatsynthetase 2 | SPS2 | Synthese von Selenophosphat für die Selenoproteinsynthese |
| Selenoprotein P | SelP | Antioxidanz im Plasma assoziiert mit Endothel, Transportprotein |
| Selenoprotein W | SelW | Antioxdanz in Herz und Skelettmuskulatur? |
| 15 kDa Selenoprotein | | Antioxidanz im Schutz gegen Krebs?, hohe Gehalte in der Prostata |
| 18 kDa Selenoprotein | | Hohe Gehalte in Niere und anderen Geweben; Funktion unklar; Erhalt im Selenmangel |
| DNA gebundenes Spermatidselenoprotein | | GPx-ähnliche Aktivität, in Magen und Spermienzellkern, Schutz bei Spermatogenese? |

#### 2.1.5.1 Cytosolische Glutathionperoxidase (cGPx)

Das nahezu ubiquitär vorkommende Enzym Glutathionperoxidase wird im Allgemeinen als klassische oder cytosolische Glutathionperoxidase (cGPx) bzw. GPx-1 bezeichnet. 1957 beschrieb MILLS als Erster die Aktivität der Glutathionperoxidase (GPx) und ihre Funktion zum Schutz der roten Blutkörperchen vor oxidativ bedingter Hämolyse. 1973 konnte die GPx durch ROTRUCK et al. (1973) und FLOHÉ et al. (1973) als selenhaltiges Enzym identifiziert werden. Durch chemische Derivatisierung wurde schließlich nachgewiesen, dass Selenocystein sich tatsächlich im aktiven Zentrum des Enzyms befindet (FORSTROM et al. 1978). Das

tetramere Enzym besteht aus vier identischen selenocysteinhaltigen Untereinheiten, die jeweils circa 22 kDa wiegen (GÜNZLER et al. 1984).

Die cytosolische Glutathionperoxidase katalysiert die Reduktion von löslichen Wasserstoffperoxiden und anderen organischen Hydroperoxiden zu Wasser und Alkoholen durch die Oxidation von Glutathion. Die Glutathionreduktase schließt den Kreislauf durch die Reduktion des oxidierten Glutathions. Als Substrat dient hierbei NADPH (PAGLIA und VALENTINE 1967). Das Aktive Zentrum der Glutathion-peroxidase-Familie bildet eine Aminosäure-Triade bestehend aus Selenocysteine$^{46}$ Tryptophan$^{136}$ und Glutamin$^{81}$. Hierbei wird die Selenolgruppe des Selenocysteins durch die Iminogruppe eines Trp$^{136}$-Restes und durch die Aminogruppe eines Glu$^{81}$-Restes über Wasserstoffbrücken polarisiert. Das dissoziierte Selenol wird durch Hydroperoxide oxidiert und das Derivat der selenigen Säure wird in zwei Stufen durch ein Thiol, vorzugsweise GSH, reduziert (EPP et al. 1983, URSINI et al. 1995). Hierbei wird die hohe GSH-Affinität der cGPx auf vier Argininreste zurückgeführt, die das aktive Zentrum umgeben. GSH wird durch die Ausbildung von u.a. Wasserstoff-brücken dem aktiven Zentrum sozusagen zugeführt (URSINI et al. 1995). Der Austausch von Selenocystein gegen Cystein in dem aktiven Zentrum verursacht eine Abnahme der Enzymaktivität. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Selenocystein bei einem physiologischen pH-Wert ein effizienterer Redoxkatalysator ist als Cystein (ROCHER et al. 1992, STADTMAN 1996).

Zusätzlich wird der cGPx im Organismus eine Funktion als biologischer Puffer und Speicher für Selen zugesprochen, denn bei Se-Mangelernährung von Tieren kann zwar eine dramatische Abnahme der cGPx-Aktivität beobachtet werden, jedoch scheinbar ohne negative klinische Auswirkungen (ARTHUR und BECKETT 1994). Diese Eigenschaften machen die cGPx außerdem zu einem geeigneten Selen-statusparameter (BEHNE und WOLTERS 1983, WHANGER et al. 1988).

Unter physiologischen Bedingungen kommt der cGPx bei der Entgiftung von Hydro-peroxiden im Zusammenspiel mit Vitamin E, Katalase und Superoxiddismutase offenbar keine lebensnotwendige Funktion zu. HO et al. (1997) konnten bei cGPx-Knockout-Mäusen eine normale Entwicklung und keine histopathologischen Veränderungen bis zu einem Alter von 15 Monaten beobachten. Auch unter moderatem oxidativen Stress (>99% $O_2$) zeigten die Mäuse keine verkürzte Überlebensrate. Die cGPx ist jedoch in der Lage, Mäuse vor einem extremen oxidativen Stress zu schützen. Hohe Paraquatgaben führen bei GPx-Knockout-Mäusen und Selen-

mangel-Mäusen schneller als bei Kontrollmäusen zu der Bildung von Produkten der Lipidperoxidation bzw. Proteinoxidation und schließlich zum Tode *(*De HAAN et al. 1998, CHENG et al. 1999a*)*. Der antioxidative Schutz der cGPx spielt des Weiteren eine Rolle bei dem Schutz vor viralen Krankheitserregern. Der Anstieg des Peroxidspiegels in cGPx-Knockout- bzw. Selenmangel-Tieren bewirkte eine erhöhte Mutationsrate in der RNA von avirulenten Coxsackieviren und führte bei den Versuchstieren zu einer Myokarditis. Nach der Passage durch die Mäuse ohne cGPx-Schutz wies das Virus Punktmutationen auf. Diese Mutationen riefen nun auch in Kontrollmäusen eine virulente Wirkung hervor (BECK et al. 1994, 1998).
Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen ROS und Apoptose besteht. Die cGPx als Bestandteil des antioxidativen Schutzsystems wird als ein Inhibitor des programmierten Zelltodes gesehen (KAYANOKI et al. 1996, DEMELASH et al. 2004, TANG et al. 2005, FAUCHER et al. 2005).

#### 2.1.5.2 Plasmatische Glutathionperoxidase (pGPx)

Die plasmatische Glutathionperoxidase (pGPx, GPx-3, eGPx) wurde 1987 erstmals aus humanem Plasma isoliert (TAKAHASHI et al. 1987). Im Gegensatz zu den anderen Glutathionperoxidasen ist die pGPx ein extrazelluläres Selenoglykoprotein. In einer Selenmangelsituation reagiert die pGPx jedoch analog zu der cGPx mit einem drastischen Abfall der Enzymaktivität und eignet sich somit als Parameter des Selenstatus (ULLREY 1987, WHANGER et al. 1988). Es handelt sich bei der pGPx um ein tetrameres Enzym mit vier identischen Untereinheiten, die jeweils ein Molekulargewicht von ca. 23 kDa haben.
Die pGPx-RNA konnte in Leber, Lunge, Herz und Mamma nachgewiesen werden (CHU et al. 1992). Die Hauptquelle der pGPx-RNA jedoch ist die Niere. Von den proximalen Nierenkanälchen wird das Enzym basolateral abgesondert (YOSHIMURA et al. 1991, WHITIN et al. 2002).
Untersuchungen haben gezeigt, dass pGPx effizient die Reduktion von Wasserstoffperoxid und anderen organischen Peroxiden und Phospholipidhydroperoxiden katalysiert, wenn Glutathion in hyperphysiologischen Konzentrationen als Elektronendonator fungiert (TAKAHASHI et al. 1987, YAMAMOTO et al. 1993). Aufgrund der geringeren Spezifität der pGPx (10%) zu GSH im Vergleich zu cGPx und der geringen GSH-Konzentration (<0,5 μM) im Blutplasma wurde jedoch nach anderen Verbindungen gesucht, die der pGPx als reduzierende Substanzen dienen könnten

(BJÖRNSTEDT et al. 1994). Neben GSH konnten BJÖRNSTEDT et al. (1994) das Thioredoxin- und Glutredoxin-System als Elektronenquellen für pGPx identifizieren.

#### 2.1.5.3 Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase (PHGPx)

1985 konnte die Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase (PHGPx) als zweite Glutathionperoxidase im Säugetier identifiziert werden (URSINI et al. 1985). Im Gegensatz zu den übrigen Glutathionperoxidasen ist PHGPx ein Monomer mit einem Molekulargewicht von ca. 19 kDa. Je nach Tierart weist die PHGPx nur eine ca. 30%ige Sequenzübereinstimmung mit den anderen Glutathionperoxidasen auf (BRIGELIUS-FLOHÉ et al. 1994). Das Enzym liegt in somatischen Zellen hauptsächlich im Cytosol vor, es kommt zu einem geringen Teil aber auch als membranständige Form vor (ROVERI et al. 1994).

Der einzigartige monomere Charakter (Zugänglichkeit des aktiven Zentrums) ermöglicht der PHGPx eine große Substratbreite und Membranaffinität (THOMAS et al. 1990, BRIGELIUS-FLOHÉ et al. 1994, URSINI et al. 1995). Denn neben Phospholipidhydroperoxiden kann die PHGPx auch andere Lipidhydroperoxide (Fettsäure-, Cholesterol-, Cumolhydroperoxide) und Wasserstoffperoxid zu Alkoholderivaten bzw. Wasser umwandeln (URSINI et al. 1985, THOMAS et al. 1990). PHGPx weist eine niedrige Affinität gegenüber Glutathion auf und besitzt im Gegensatz zu der cGPx im Zentrum keine Glutathionbindungsstellen. Daher kann PHGPx als Reduktionsmittel neben Glutathion auch andere Substrate (z.B. Dithiole) verwenden. Als physiologischer Elektronendonator konnte bis heute jedoch kein Substrat gefunden werden, welches effektiver mit PHGPx reagiert als GSH (URSINI et al. 1995).

Im Organismus schützt die PHGPx zusammen mit Vitamin E Biomembranen vor der Zerstörung durch Peroxide. Vitamin E reagiert mit Hydroxylperoxylradikalen (LOO•), die bei der eiseninduzierten Lipidperoxidation von Biomembranen entstehen, zu Lipidhydroperoxiden (LOOH). Anschließend reagiert das PHGPx/GSH-System mit LOOH und entgiftet diese Verbindung zu einem Alkoholderivat und Wasser. Bei einem Mangel an PHGPx können LOOHs nicht abgefangen werden und es entstehen Alkoxylradikale (LO•). Vitamin E jedoch ist gegen LO• ein relativ schwaches Antioxidanz, welches keine Termination der Reaktion bewirkt, d.h. nur in Gegenwart von PHGPx ist eine effektive Verhinderung der Lipidperoxidation möglich (MAIORINO et al. 1989).

Selenmangel wird mit herabgesetzter männlicher Fertilität in Verbindung gebracht. Bereits 1973 konnten WU et al. bei männlichen Ratten im Selenmangel eine stark

herabgesetzte Spermienmotilität beobachten, die auf Veränderungen am Mittelstück reifer Spermien zurückzuführen war. Da Vitamin E und andere Antioxidanzien keinen Einfluss auf die Spermienqualität im Selenmangel hatten, wurde Selen eine spezifische Funktion in den Testes zugesprochen. PHGPx existiert in testikulären Gewebe als cytosolische, mitochondriale und nukleare Form und wird heute verstärkt mit der Reifung und Funktion von Spermien in Verbindung gebracht. Untersuchungen von URSINI et al. (1999) haben gezeigt, dass die Helix der Spermienmitochondrien in einer Kapsel eingebettet ist, die zu 50% aus PHGPx besteht. Während der Spermienreifung erfährt die PHGPx eine Veränderung in der biologischen Rolle von einem Enzym zum Schutz vor Peroxidschäden in Spermatiden zu einer inaktiven, unlöslichen Matrixkomponente in reifen Spermien. Diese Beobachtung ist vermutlich auf eine Veränderung des Redox-Status während der Spermatogenese zurückzuführen. Die oxidative Verschiebung führt zu einer verstärkten Bildung von niedermolekularen Dithiolen im Prozess der Spermienreifung (SHALGI et al. 1989). Die damit verbundene Abnahme der GSH-Konzentration und die geringe Spezifität von PHGPx zu GSH als Substrat führt nun zu der Polymerisation von PHGPx über die Reaktion von $Sec^{46}$ mit $Cys^{148}$ anderer PHGPx-Moleküle. Eine Quervernetzung der Moleküle und eine Bindung an die Mitochondrienkapsel wird vermutlich analog durch Reaktion mit Proteinthiolen z.B. SCMP (sperm mitochondrial cysteine-rich protein) der Membranoberfläche erzielt (MAURI et al. 2003). MAIORINO et al. (2005) konnten zeigen, dass SCMP mit seinen zahlreichen Cysteinresten als Substrat für PHGPx, während der Spermatogenese dient. Die PHGPx katalysiert die Bildung von Disulfiden zwischen benachbarten Cysteinresten von SCMP und führt zu einer Konformationsänderung, die als „redox-switch“ bezeichnet wird. Diese Strukturen unterliegen häufig einer Neuordnung und werden als Zwischenstufe bei der Proteinfaltung gesehen (CEMAZAR et al. 2003). MAIORINO et al. (2005) spekulieren, dass auch die Neuordnung des SCMP-Cystins eine Zwischenstufe der Polymerisation darstellt und schließlich zu der beschriebenen Strukturveränderung und Stabilisierung der Mitochondrienkapsel führt.

Die Nukleus-PHGPx (nPHGPx) ist ein Zellkernprotein und die dritte Isoform der PHGPx, welcher ebenfalls Funktionen bei der Spermienreifung zukommen. Die nPHGPx unterscheidet sich von den anderen Isoformen durch einen argininreichen N-Terminus. Bei der nPHGPx handelt es sich um eine Proteinthiolperoxidase, welche

die Chromatinkondensation bei der Spermatogenese durch die Quervernetzung von Proteindisulfiden stabilisiert (PFEIFER et al. 2001, CONRAD et al. 2005).
Neben diesen Funktionen konnten zahlreiche Studien zeigen, dass die PHGPx redoxregulatorische Funktionen im Zellstoffwechsel übernimmt. Durch ihre Wirkung auf z.B. Lipoxygenase, nuclear factor-κB (NF-κB) und Cytochrom c kann der PHGPx eine Rolle bei Signaltransduktion, Apoptose, Zellproliferation und Entzündungsgeschehen zugewiesen werden (NAKAGAWA 2004, BRIGELIUS-FLOHÉ et al. 1997, IMAI et al. 1998, CHEN et al. 2003, SHIDOJI et al. 2006).

#### 2.1.5.4 Thioredoxinreduktase (TrxR)

Die Thioredoxinreduktase (TrxR) wurde erstmals in den späten siebziger Jahren beschrieben, aber erst 1996 konnte sie aus menschlichen Zellen isoliert und als Selenoprotein charakterisiert werden (GLADYSHEV et al. 1996, TAMURA et al. 1996). Bis heute konnten ubiquitär zwei Hauptformen, nämlich eine cytosolische (TrxR1) und eine mitochondriale (TrxR2) Thioredoxinreduktase im Säugetier identifiziert werden (LEE et al. 1999). Bei den Thioredoxinreduktase-Isoformen handelt es sich um Homodimere mit einem redoxaktiven Disulfid. TrxRs enthalten FAD als prosthetische Gruppe und reduzieren in Abhängigkeit von NADPH das Disulfid im aktiven Zentrum des oxidierten Thioredoxins (GLADYSHEV et al. 1996, TAMURA et al. 1996). Thioredoxin ist eine Disulfidreduktase.
Diese Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen übernehmen im Organismus zahlreiche Aufgaben (Abb. 3). Sie sind effiziente Elektronentransporteure für Enzyme, die die Reduktion von Nukleotiden bei der DNA-Synthese katalysieren. Zu diesen Enzymen gehört die Ribonukleotidreduktase, die für die Bereitstellung von Desoxyribonukleotiden für die DNA-Synthese verantwortlich ist. Das Thioredoxin-System wird mit einer Reihe weiterer Prozesse in Verbindung gebracht. Dazu gehören die Reduktion von Glutathionperoxidasen (BJÖRNSTEDT et al. 1994), Disulfidisomerasen (LUNDSTROM et al. 1990), Dehydroascorbate (MAY et al. 1997), ascorbylfreie Radikale (MAY et al. 1998), Selenite, Selenodiglutathion (BJÖRNSTEDT et al. 1995b) und Lipidhydroperoxidasen (BJÖRNSTEDT et al. 1995a). Diese Prozesse werden teilweise über das Thioredoxin-System katalysiert, einige jedoch direkt durch die TrxR. Die geringe Substratspezifität der TrxR wird zum einen auf die C-terminale Lage von Selenocystein in der Aminosäuresequenz Cys-Sec-Gly und zum anderen auf redoxaktive Cysteinreste in der FAD-bindenden Region des Moleküls zurückgeführt. Das Zusammenspiel dieser aktiven Zentren im

Molekül ist entscheidend für die Aktivität der TrxR (LEE et al. 2000, SANDALOVA et al. 2001, GLADYSHEV et al. 1996).

Durch die schnelle und umkehrbare Reaktion spielt die Thiol-Disulfid-Austauschreaktion auch bei der Signaltransduktion durch z.B. Protein-Tyrosin-Phosphatasen und bei der Regulation der Genexpression zahlreicher Transkriptionsfaktoren eine Rolle. So werden einige Transkriptionsfaktoren durch die Redoxregulation von Thioredoxin aktiviert oder deaktiviert, z.B. nuclear factor κB (NF-κB), activator protein 1 (AP-1) und tumor supressor protein (p53) (HAYASHI et al. 1993, HIROTA et al. 1997, SAKURAI et al. 2004, TURUNEN et al. 2004).

Des Weiteren haben Untersuchungen gezeigt, dass das Thioredoxin-System auch das Zellwachstum stimulieren und den Prozess der Apoptose verhindern kann. In Eukaryonten bildet reduziertes Thioredoxin einen Komplex mit einer Apoptosekinase (ASK-1), der zu einer Hemmung der Apoptose führt, d.h. bei zunehmendem oxidativen Stress wird die Apoptose durch Vorliegen hoher Konzentrationen oxidierten Thioredoxins induziert (SAITOH et al. 1998).

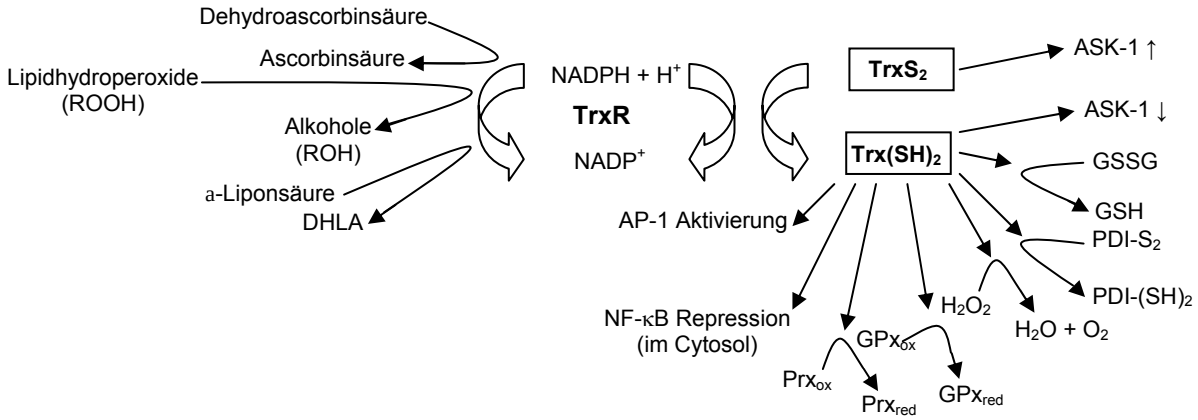



***Abbildung 3:*** *Funktionen des Thioredoxin-Systems (NORDBERG und ARNÉR 2001)*

Vor wenigen Jahren konnte ein weiteres Mitglied der TrxR Familie identifiziert werden. Es handelt sich dabei um eine selenhaltige Thioredoxin/Glutathion-Reduktase (TGR). Dieses Enzym weist eine breite Substratspezifität auf und kann als TrxR, GR und Glutredoxin fungieren (SUN et al. 2001). Da TGR nach der Pubertät in den Testes akkumuliert, wird es auch als testikuläre TrxR bezeichnet. SU et al. (2005) untersuchten die Funktion von TGR in der Spermatogenese und konnten Hinweise auf eine Funktion bei der Spermienreifung entdecken. Aus den durch-

geführten Untersuchungen geht hervor, dass TGR wie PHGPx die Bildung von Disulfiden in der Mitochondrienkapsel katalysiert und diese so stabilisiert (siehe 2.1.5.3).
NONN et al. (2003), CONRAD et al. (2004) und JOKUPOGLU et al. (2005) konnten die bedeutende Funktion des Thioredoxin-Systems durch die gescheiterte Zucht von TrxR1- bzw. TrxR2-Knockout-Mäusen belegen. Denn der Verlust dieser Gene führt zum embryonalen Frühtod.

### 2.1.6 Regulation der Genexpression von Selenoproteinen

Die Biosynthese von Selenoproteinen ist abhängig von der Verfügbarkeit des Selens. Bei einer limitierten Selenzufuhr erfolgt die Bildung von Selenoproteinen nach einer strengen Hierarchie (Abb. 4). Einige Selenoproteine reagieren auf Selenmangel mit einem schnellen Aktivitätsverlust, andere bleiben stabil und verlieren erst bei anhaltendem Mangel an Aktivität. Umgekehrt verhält es sich bei erneuter Selenzufuhr nach einer Mangelphase. Die Selenoproteine, die einen langsamen Aktivitätsverlust aufweisen, werden im Organismus schneller ersetzt als die, die schneller mit einem Aktivitätsverlust auf Selenmangel reagieren (BRIGELIUS-FLOHÉ 1999).
In einem Versuch von WEISS SACHDEV und SUNDE (2001) trat während eines dreißigtägigen Selenmangels eine signifikante Abnahme der cGPx-Aktivität auf. So fiel die cGPx-Aktivität in der Leber von männlichen und weiblichen Ratten auf ca. 3% im Vergleich zur selenversorgten Kontrollgruppe ab. Die PHGPx wies ebenfalls einen Aktivitätsverlust im Selenmangel auf. Dieser war jedoch nicht so gravierend wie der Verlust an cGPx-Aktivität und lag bei ca. 20% im Vergleich zur Kontrollgruppe.
Eine Langzeituntersuchung von WEITZEL et al. (1990) zeigte, dass die GPx-Aktivität bei Mäusen, die eine Selenmangeldiät erhielten, in Leber, Niere und Lunge rapide abnahm und nach 130 Tagen rund 3% der Aktivität in der Kontrollgruppe entsprach. Die Aktivität der PHGPx nahm wesentlich langsamer ab und wies noch nach 250 Tagen eine Restaktivität von 30-70% in den verschiedenen Organen auf. TrxR, ein weiteres Selenoenzym, verhält sich in verschiedenen Organen ähnlich wie PHGPx. BERGGREN et al. (1999) verglichen die Entwicklung der TrxR- und cGPx-Aktivität über einen Zeitraum von 100 Tagen bei Selenmangel oder Se-adäquat versorgten Ratten in verschiedenen Organen. So fiel die Aktivität der TrxR in Leber Lunge und Niere langsamer ab als die der cGPx und erreichte nach 100 Tagen noch Aktivitäten zwischen 12-50% der Kontrolle (0,1 mg Se/mg Diät). Bei anderen Organen (Milz, Prostata) mit einer niedrigen TrxR-Ausgangsaktivität hingegen konnte kein signi-

fikanter Abfall der TrxR-Aktivität im Vergleich zu der Kontrollgruppe beobachtet werden.

Die Abnahme bestimmter Selenoproteine steht im Zusammenhang mit der Abnahme der dazugehörigen mRNA. Dies kann als weiteres Kriterium für die hierarchische Einteilung der Selenoproteine genutzt werden.
LEI et al. (1995) konnten zeigen, dass die PHGPx höher in der Hierarchie steht als die cGPx. In einem Versuch wurden an Ratten Diäten mit Selengehalten zwischen 2 und 130 μg Se/ kg Diät gefüttert. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der PHGPx-mRNA-Konzentration in Herz und Leber. Bei der cGPx nahm die mRNA-Konzentration ab und erreichte bei der Selenmangelgruppe noch 6% bzw. 12% in der Leber und im Herz im Vergleich zu den Kontrolltieren. mRNA Stabilitätsstudien zeigen, dass pGPx und cGPx im Selenmangel ähnlich reguliert werden.
Bei einer Untersuchung von NAKANE et al. (1998) nahmen die mRNA-Konzentrationen bei cGPx und pGPx in der Niere von Ratten, die selenarm ernährt wurden, in vergleichbarem Maße ab und erreichten am Versuchsende nach vier Wochen 24% bzw. 23% der Konzentrationen in den Kontrollgruppen.
Selenmangel führte in HepG2- und CaCo-2-Zellen sogar zu einer Zunahme der GIGPx-mRNA-Gehalte. Demgegenüber konnte eine deutliche Abnahme bei cGPx gemessen werden während die PHGPx unverändert blieb. Bei Repletion von Selen zeigte die GIGPx-Proteinkonzentration bereits nach 10 h einen deutlichen Anstieg. Diese Beobachtung konnte bezüglich der cGPx erst nach 24 h gemacht werden. Die ausgeprägte Stabilität der GIGPx-mRNA und die schnelle Synthese nach einem Selenmangel steht in einem deutlichen Kontrast zu dem Verhalten der cGPx und deutet darauf hin, dass die GIGPx in der Hierarchie der Glutathionperoxidasen mit der PHGPx vergleichbar ist und möglicherweise den höchsten Rang (WINGLER et al. 1999) einnimmt (Abb. 4).

$$\text{GIGPx} \geq \text{PHGPx} > \text{TrxR} > \text{cGPx} = \text{pGPx}$$

***Abbildung 4:*** *Hierarchie der Selenoenzyme (modifiziert nach BRIGELIUS-FLOHÉ 1999 und SUNDE 2001)*

Die hier beschriebenen Beobachtungen wurden nicht auf eine herabgesetzte Transkription, sondern auf einen Stabilitätsverlust der mRNA zurückgeführt. In den

vergangenen Jahren wurden auf Grund verschiedener Untersuchungen mehrere Hypothesen aufgestellt, die eine Erklärung für die Regulation der Genexpression von Selenoproteinen ermöglichen sollen:

MORIARTY et al. (1998) stellten anhand von Untersuchungen die Hypothese auf, dass der ineffiziente Einbau von Selenocystein über das UGA Codon, durch einen Mangel an Selenocysteinyl-tRNA$^{sec}$ ausgelöst, während der mRNA-Translation zu einem „nonsense-mediated decay“ (NMD) der mRNA führt. Denn allgemein führt ein UGA Codon, welches >50-55 Nukleotide (nt) vor dem letzten „3´exon-exon junction“ liegt, zu einer Termination und die RNA unterliegt dem NMD (NAGY und MAQUAT 1998, SUN et al. 2000). Die Glutathionperoxidasen erfüllen diese Regel.

Modifikationen der tRNA$^{sec}$, die selenabhängig reguliert werden, führten ebenfalls zu einer veränderten Expression der Selenoenzyme (CARLSON et al. 2005). WEN et al. (1998) untersuchten den Einfluss der UGA-Position auf die Effizienz der Selenocysteinsynthese für die cGPx und stellten fest, dass das UGA Codon für einen optimalen Sec-Einbau >21 nt vom AUG Startcodon und >204 nt vom SECIS Element entfernt liegen muss.

Auch die Codons die dem UGA-Codon vorausgehen veränderten in einer Untersuchung von NASIM et al. (2000) die Effizienz des Sec-Einbaus dramatisch.

FLOHÉ et al. (1997) jedoch gehen davon aus, dass spezifische Proteine an die 3´UTR binden und selenabhängig die mRNA vor dem Abbau schützen. FLETCHER et al. (2001) untersuchten in diesem Zusammenhang die Affinität des SECIS Elements zu SBP2 bei unterschiedlichen Selenoproteinen und stellten fest, dass die geringen Affinitätsunterschiede der verschiedenen SECIS-Elemente nicht für die Hierarchie der Selenoproteinexpression *in vivo* verantwortlich sein können.

Auch MÜLLER et al. (2003) rückten die 3´UTR in das Zentrum einer Untersuchung. Hierbei kombinierten sie die 3´UTR mit den kodierenden Regionen der mRNA dreier Glutathionperoxidasen. Die Ergebnisse zeigten, dass die 3´UTR´s der stabilen PHGPx und GIGPx alleine nicht in der Lage waren, die cGPx zu stabilisieren. Gleichzeitig führte die 3´UTR von cGPx zu einem Stabilitätsverlust bei GIGPx und PHGPx. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass sowohl die 3´UTR als auch die kodierende Region der cGPx mRNA einen Einfluss auf die Stabilität des Enzyms ausüben. Vermutlich spielen hier weitere selenabhängige Schutzfaktoren eine Rolle.

### 2.1.7 Selenstatus (Se-Mangel, supranutritive Se-Aufnahme, Se-Toxizität)

*Selenmangel*

Die Bedeutung von Selen ist neben der Funktion im Hormonhaushalt und als Strukturprotein vor allem auf den oxidativen Zellschutz zurückzuführen. Daher kann Selenmangel zu schwerwiegenden Veränderungen im Organismus führen.

Das Auftreten von Selenmangelsymptomen ist bei Nutztieren vor allem auf die Fütterung von selenarmen Proteinen zurückzuführen. Ein marginaler Selenmangel führt zu Fruchtbarkeitsstörungen, embryonalem Fruchttod, Kümmern, Leistungsabfall und einer erhöhten Anfälligkeit für Krankheiten.

Ein klinisch manifester Selenmangel äußert sich bei landwirtschaftlichen Nutztieren in Form verschiedener Selenmangelkrankheiten (PALLAUF und MÜLLER 2006). In der Regel sind junge Tiere betroffen. Bei jungen Wiederkäuern führt Selenmangel zu einer Degeneration der Herz- und Skelettmuskulatur, die als nutritive Muskeldystrophie oder „Weißmuskelkrankheit“ bezeichnet wird. Schweine zeigen im Selenmangel Wachstumsdepressionen, Leberentzündungen (Hepatosis dietetica) und Herzmuskeldystrophien, die so genannte „Maulbeerherzkrankheit“ (ROSSOW und BOLDUAN 1994). Auch beim Geflügel treten Muskeldystrophien auf sowie die exsudative Diathese, eine Permeabilitätsstörung im Muskelgewebe (SCOTT 1987).

Selenmangel bei Menschen ist in entwickelten Ländern im Allgemeinen kein Problem, da diese Menschen Zugang zu einer Bandbreite an Nahrungsmitteln aus verschiedenen Quellen haben. Menschliche Krankheiten, die mit Selenmangel in Verbindung gebracht werden, treten nur in entlegenen ländlichen Gebieten mit extremem Selenmangel auf (KÖHRLE et al. 2000). Zu diesen Krankheiten zählen die Keshan-Krankheit und die Kashin-Beck-Krankheit, die in China, Sibirien und Nordkorea beobachtet werden.

Bei der Keshan-Krankheit handelt es sich um eine juvenile Kardiomyopathie unbekannter Herkunft, die erstmals 1935 in der chinesischen Region Keshan beschrieben wurde. 1979 konnten chinesische Forscher eine Verbindung der Keshan-Krankheit zu Selen herstellen, da Selenitgaben eine effektive Prophylaxe darstellen. Aufgrund des epidemieartigen Auftretens wird diese Krankheit jedoch ebenfalls einem infektiösen Agens zugeschrieben. Später konnten Coxsackie-Viren aus dem Gewebe von Patienten isoliert werden, die an der Keshan-Krankheit erkrankt waren (LEVANDER et al. 1997, CERMELLI et al. 2002). Eine Untersuchung von BECK et al. (1998) konnte bei Mäusen die Wirkung der Viren im Zusammenhang mit einem

fehlenden Selenoprotein darstellen. Der Anstieg des Peroxidspiegels in cGPx-Knockout- bzw. Selenmangel-Tieren bewirkte eine erhöhte Mutationsrate in der RNA von avirulenten Coxsackieviren und führte bei den Versuchstieren zu einer Myokarditis. Nach der Passage durch die Mäuse ohne cGPx-Schutz wies das Virus Punktmutationen auf. Diese Mutationen riefen nun auch in Kontrollmäusen eine virulente Wirkung hervor (BECK et al. 1994, 1998). In vitro Studien haben gezeigt, dass Natriumselenit die Replikation des Coxsackie-Virus-B5-Strangs verhindert, während andere Selenverbindungen, z.B. Selenate, Selenoaminosäure und Selenomethionin die Vermehrung nicht unterbinden. Die antivirale Wirkung von Selenit auf den Coxsackie-Virus ist möglicherweise auf eine Beeinträchtigung virusspezifischer RNA-Polymerasen zurückzuführen (CERMELLI, 2002).

Die Auslöser der Kashin-Beck Krankheit sind noch weitergehend unbekannt. Es handelt sich um eine Osteoarthropathie, die bei Kindern und jungen Erwachsenen in Selenmangelregionen von China, Sibirien, Nordkorea und Tibet auftritt. Wissenschaftliche Untersuchungen deuten daraufhin, dass eine Kombination aus Selen- und Jodmangel den Ausbruch der Krankheit begünstigt (MORENO-REYES et al. 1998). Die Behandlung erkrankter Kinder mit Selenit führte zu einem deutlichen Rückgang der Krankheit im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe. In den letzten Jahrzehnten hat die Verbreitung der Kashin-Beck-Krankheit in den betroffenen Regionen deutlich nachgelassen. Dies könnte auf einen verbesserten Ernährungsstatus zurückzuführen sein. Ähnlich wie bei der Keshan-Krankheit wird der Ausbruch der Kashin-Beck-Krankheit vermutlich auch durch pathogene Faktoren gefördert, z.B. Mykotoxine (GE und YANG 1993).

*Supranutritive Selenaufnahme*

Während Selenmangelerkrankungen seit geraumer Zeit bekannt sind und die physiologischen Folgen eines marginalen Selenmangels für beispielsweise Fruchtbarkeit, Immunsystem und Virusinfektionen aufgedeckt werden, rücken auch die möglichen positiven Effekte von supranutritiven Selengaben, d.h. Selenaufnahme über der empfohlenen Tagesdosis, die jedoch keine Toxizität auslösen, in den Mittelpunkt des Interesses (Abb. 5). Solche Selendosierungen führen zu einer erhöhten Akkumulation von Selen im Gewebe und zu einer vermehrten Produktion von aktiven methylierten Zwischenprodukten des Selenstoffwechsels, während die cGPx bereits abgesättigt ist (COMBS und COMBS 1986, IP 1998).

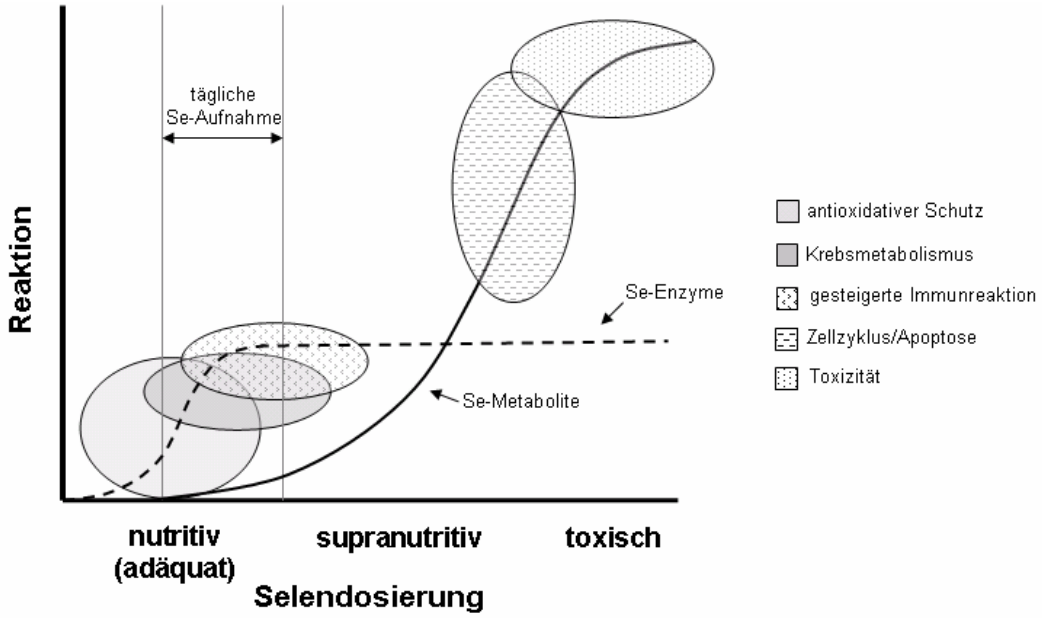



***Abbildung 5:*** *Selendosierung und physiologische Reaktionen (modifiziert nach COMBS und GRAY 1998)*

Zahlreiche Tierversuche mit unterschiedlichsten Spezies, krebsauslösenden Chemikalien und Viren in verschiedenen Zielorganen wurden in den letzten Jahrzehnten durchgeführt und konnten die anticarcinogene Wirkung des Selens in supranutriven Dosierungen belegen (COMBS und COMBS 1986).

Des Weiteren konnten epidemiologische Studien den Einfluss von Selen auf das Wachstum bestimmter Krebsarten aufzeigen. Eine U.S. amerikanische Langzeitstudie zu der präventiven Wirkung einer supranutritiven Selensupplementation (200 μg/d) auf Hautkrebspatienten konnte nach zehn Jahren ein niedrigere krebsabhängige Sterblichkeitsrate nachweisen. Vor allem die signifikant niedrigere Prostata-, Lungen- und Colonkrebsinzidenz in dieser Studie führte zu wachsendem Interesse an Selen als Mittel der Krebsprävention (CLARK et al. 1998). Erweiterte Auswertungen dieser Studie, sowie ausgewählte Tiermodelle zeigen, dass supranutritive Selengaben allerdings auch die Krebsentwicklung fördern können. So führten die supranutritiven Selengaben bei den Patienten der U.S. amerikanischen Langzeitstudie zu einem erhöhten Auftreten von Hautkrebs (DUFFIELD-LILLICO et al. 2003). Eine Untersuchung von WATERS et al. (2005) an älteren Hunden zeigte den Zusammenhang zwischen Selensupplementierung, DNA-Schäden der Prostatazellen und Prostatakrebsrisiko, denn die Schäden an den Prostatazellen nahmen bei

den Hunden bereits bei einer suboptimalen bzw. supraoptimalen Selensupplementierung zu.
Die Unterdrückung des Krebswachstums durch supranutritive Selengaben ist vermutlich bei marginaler Selenversorgung auf optimale Expression von Selenoproteinen zurückzuführen, während die Effekte erhöhter Selengaben bei ausreichender Basisversorgung auf einer erhöhten Selenstoffwechsellage beruhen, die zur vermehrten Bildung von Se-Metaboliten führt. Diese biologisch aktiven Metabolite können Immunsystem, Zellwachstum, Zellzyklus und Apoptose in Krebszellen beeinflussen (COMBS und GRAY 1998, IP 1998, COMBS 2000).

*Selentoxizität*
Die Zufuhr von 0,1-0,3 mg Se/kg TM der Nahrung deckt den täglichen Bedarf von Menschen und landwirtschaftlichen Nutztieren in verschiedenen Leistungsstadien und unter verschiedenen Haltungsbedingungen (PALLAUF und MÜLLER 2006). Eine Selenaufnahme, die die vom NRC empfohlene maximale Selenzufuhr von 2,0 mg Se/kg TM übersteigt, führt im Organismus zu Selentoxikosen, dabei werden zwei Schweregrade unterschieden (EDMONDSON et al. 1993, ROSENFELD und BEATH 1964):

1. Akute Selenose
2. Chronische Selenose
    a. „alkali disease“ Typ
    b. „blind stagger“ Typ

Eine akute Selenvergiftung **- akute Selenose -** wird durch Aufnahme einer großen Menge von Selen während eines kurzen Zeitraumes ausgelöst (> 25 mg Se/kg TM). Die Symptome einer akuttoxischen Selendosis konnten bereits bei zahlreichen Labortieren und landwirtschaftlichen Nutztieren nach der Aufnahme von selenakkumulierenden Pflanzen, fehlerhaft-supplementierten Futterchargen oder parenteraler Ernährung beobachtet werden (HILL et al. 1985, BAKER et al. 1989). Neben einem knoblauchartigen Atem gehören Atemnot, Krämpfe, Durchfall und Erbrechen zu den Symptomen. Zu den pathologischen Veränderungen zählen Herzmuskelveränderungen, Lungenödeme, Blutsturz, sowie Leber- und Nierennekrosen. Eine akute Selenose führt häufig zum Tod der Tiere durch Lungenversagen. Die letale

Dosis ist dabei abhängig von Selenverbindung, weiteren Rationskomponenten und Zeitraum der erhöhten Selenaufnahme (ANONYMOUS 1983, FAN und KIZER 1990). Die klassische - **chronische Selenose** - ist unter dem Begriff „alkali disease“ bekannt. Die Ausprägung der Krankheit ist abhängig von der Selenverbindung, Gehalt und Qualität anderer Rationskomponenten (Vitamin E, Proteinqualität/quantität), Tierart und Alter (BARCELOUX 1999, ANONYMOUS 1983). Die chronische Selenose wird bei landwirtschaftlichen Nutztieren durch die Aufnahme von Gräsern oder Getreide mit einem Gehalt von 5-40 mg Se/kg über einen Zeitraum einiger Wochen oder Monate ausgelöst. Die Tiere weisen typische Symptome auf, zu diesen gehören Lähmungen, Verformungen der Hufe bzw. Klauen, Haarausfall und Abmagerung (ANONYMOUS 1983). So konnten CASTEEL et al. (1985) und HARRISON et al. (1983) bei Schweinen, die durch überhöhte Selengehalte im Futter chronische Selenvergiftungen aufwiesen und oben erwähnte Symptome zeigten, postmortem Kronenrandläsionen, Rückenmarksdegenerationen und Lebernekrosen finden.

Das Auftreten einer - **subakuten Selenose -** einer weiteren Form der chronischen Selenose, wird mit dem Begriff „blind stagger“ in Verbindung gebracht. Diese Erkrankung tritt in erster Linie bei Rindern auf und wird neben Selen vermutlich auch von anderen Toxinen ausgelöst (VAN KAMPEN und JAMES 1978). Im Westen der USA konnte „blind stagger“ bei Tieren beobachtet werden, die über Wochen eine limitierte Menge selenakkumulierender Pflanzen (> 100 mg Se/kg TM) aufgenommen hatten (ROSENFELD und BEATH 1964, FAN und KIZER 1990). Die betroffenen Tiere sind unruhig und verlieren stark an Körpermasse. Im weiteren Verlauf der Erkrankung erblinden die Tiere und es kommt zu Ataxien und Atemnot. Im Endstadium der Krankheit treten Lähmungen auf und der Tod tritt als Folge von Lungenversagen ein (FAN und KIZER 1990).

Die Toxizität des Selens hängt von der Menge und der aufgenommenen chemischen Verbindung ab (Tab. 2). Die Toxizität einer Verbindung wird durch den $LD_{min}$- oder $LD_{50}$-Wert definiert. Hierbei gibt der $LD_{min}$-Wert die minimale Dosis einer Verbindung an, die zum Tode führt, während der $LD_{50}$-Wert die Dosis angibt, die in einer definierten Zeiteinheit zum Tode von 50% der Versuchstiere führt (TREVAN 1927).

***Tabelle 2:*** *Akute Toxizität verschiedener Selenverbindungen bei der Ratte anhand des $LD_{min}$- und $LD_{50}$-Wertes (modifiziert nach PAINTER 1941, SHIBATA et al. 1992)*

| Selenverbindung | mg/kg KM | akute Toxizität | Verabreichungsform |
|---|---|---|---|
| $Na_2SeO_3$ | 7 | $LD_{50}$ | oral |
| $Na_2SeO_3$ | 3,25-3,50 | $LD_{min}$ | intraperitonial |
| $Na_2SeO_4$ | 5,25-5,75 | $LD_{min}$ | intraperitonial |
| $Na_2SeO_4$ | 3,0 | $LD_{min}$ | intravenös |
| DL-Selenocystin | 4,0 | $LD_{min}$ | intraperitonial |
| DL-Selenomethionin | 4,25 | $LD_{min}$ | intraperitonial |

Untersuchungen haben gezeigt, dass Selenite *in vitro* toxischer sind als Selenate (SPALLHOLZ 1994). *In vivo* jedoch unterscheiden sich diese zwei Selenverbindungen nur noch geringfügig (PAINTER 1941, SHIBATA et al. 1992), da die direkte Reduktion von Selenaten zu Seleniten die Toxizität des Selenats bedingt. Unter den organischen Selenverbindungen weist DL-Selenocystin eine ähnliche Toxizität auf wie Selenit. DL-Selenomethionin hingegen hat eine vergleichbar geringere Toxizität (SHIBATA et al. 1992, NAKAMURO et al. 2000). Die Entgiftung von Selen erfolgt durch Methylierung. Hierbei entstehen weitere organische Verbindungen wie Dimethylselenid und das Trimethylselenonium-Ion (siehe 2.1.3), die im Tierversuch als Entgiftungsprodukte eine geringere Toxizität als Selenat, Selenit und Selenoaminosäuren aufweisen (McCONNELL und PORTMANN 1952, OBERMEYER et al. 1971, NAKAMURO et al. 2000*).*

Eine Überversorgung mit Selen führt bei Menschen und Tieren zu den typischen Vergiftungserscheinungen. PAINTER (1941) führte dies auf Interaktionen von Seleniten mit Thiolen im Organismus zurück. Bei einer akuten Selenvergiftung wird durch die Bindung von Selenit an Thiole (z.B. GSH, Cystein) eine große Menge an Selenotrisulfiden gebildet. Diese Selenotrisulfide können durch GSH weiter zu Selenopersulfiden reduziert werden (GANTHER 1968, 1971). 1989 konnten SEKO et al. diesen Mechanismus vervollständigen. Die Reaktion von Selenopersulfiden mit GSH führt zu der Bildung von Selenwasserstoff. In Kontakt mit Sauerstoff entsteht in einem ersten Schritt ein Superoxidradikal und elementares Selen (Abb. 6). Die Generation von Superoxidradikalen und weiteren reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ruft zelluläre Schäden hervor (YAN und SPALLHOLZ 1993). Des Weiteren

beeinflussen die Glutathionkonzentrationen in der Zelle die Entstehung von ROS. Denn sowohl die Depletion sowie die Anreicherung von GSH führen zu oxidativem Stress und somit zu Zellschäden (USAMI et al. 1999, SHEN et al. 2000). Generell lässt sich sagen: Selentoxizität liegt immer dann vor, wenn die oxidativen Schäden im Organismus die Möglichkeiten des Zellschutzes übersteigen (SPALLHOLZ 1994).

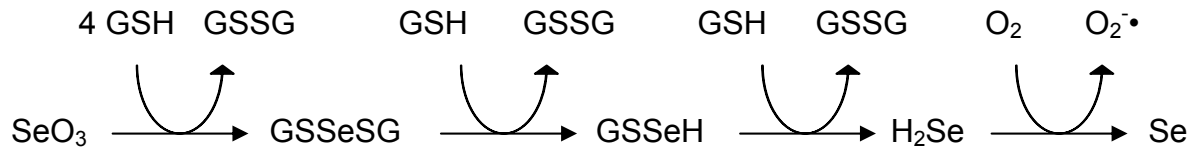



***Abbildung 6:*** *Superoxidradikal-Synthese durch Selenitkatalyse (SEKO et al. 1989)*

Die Reaktivität verschiedener Selenverbindungen mit Thiolen erklärt auch deren Toxizität. SPALLHOLZ (1994) stellt zusammenfassend dar, dass Selenite und Selendioxid, sowie Diselenide (z.B. Selenocystin) in Anwesenheit von Thiolen (z.B. GSH) zu Selenotrisulfid bzw. Selenol reagieren und so die Bildung von Superoxid und Wasserstoffperoxid generieren. Selenat und Selenoether dagegen reagieren nicht mit Thiolen, bilden keine Folgeprodukte und sind somit per se nicht toxisch. Erst die Reduktion in vivo zu Selenit oder Selenol lässt diese Verbindungen eine toxische Wirkung entfalten.

## 2.2 Physiologische Folgen von Oxidativem Stress

### 2.2.1 Oxidativer Stress

Die Entstehung höherer Lebensformen ist auf den oxidativen Metabolismus zurückzuführen. So werden beispielsweise Nahrungsstoffe einer oxidativen Phosphorylierung zur Energiegewinnung unterzogen. Die Nutzung von Sauerstoff birgt allerdings auch Gefahren, denn hierbei entstehen zwangsläufig reaktionsfreudige Sauerstoffradikale, die in der Lage sind Biomoleküle oxidativ zu verändern und somit ihre Funktion zu beeinträchtigen.

Freie Radikale sind Moleküle oder Atome mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen, die durch Entkopplung eines Elektronenpaares entstehen (BECKER 1970). Im Organismus existieren enzymatische und nichtenzymatische Verbindungen, die antioxidative Kapazitäten aufweisen. Sie schützen Zellen und Gewebe vor den Folgen einer unkontrollierten Bildung von freien Radikalen bzw. verhindern deren Reaktion mit biologischen Strukturen. Zwischen der Entstehung freier

Radikale und antioxidativen Schutzmechanismen besteht ein kritisches Gleichgewicht. SIES (1991a) definiert oxidativen Stress als *„Disturbance of the prooxidant-antioxidant Balance in favor of the former“*, d.h. eine Verschiebung des bestehenden Gleichgewichts zu Gunsten freier Radikale führt zu oxidativem Stress (MACHLIN und BENDICH 1987, SIES 1991b, CHAUDIERE und FERRARI-ILOU 1999).

### 2.2.2 Radikalentstehung

Die Entstehung von reaktionsfreudigen sauerstoffhaltigen Verbindungen ist die Folge einer Vielzahl von essentiellen biochemischen Reaktionen im Organismus. Als Diradikal kann das Sauerstoffmolekül mit gewissen organischen Verbindungen (z.B. Fettsäuren) nach einem Radikalmechanismus reagieren. Solche Reaktionen werden als Autoxidationen bezeichnet. Der Kettenstart muss jedoch induziert werden. Diese Aktivierung kann durch Redoxreaktionen, Enzyme, Absorption von Strahlung, Schwermetalle oder die Reduktion durch bestehende organische Radikale erfolgen (HALLIWELL und GUTTERIDGE 1985). Freie Sauerstoffradikale können also durch sequentielle monovalente Reduktion aus molekularem Sauerstoff gebildet werden (Abb. 7). In weiteren Reaktionsschritten entsteht eine Vielzahl weiterer Sauerstoffspezies (DIPLOCK 1981, MARKANT et al. 1995).

Zu den biologisch reaktiven Sauerstoffspezies zählt das Superoxidradikal ($O_2^-$ •). Es entsteht durch Ein-Elektronen-Reduktion und leitet die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies ein. Das Superoxidradikal liegt in nahezu allen aeroben Zellen vor und entsteht unter anderem durch die Autoxidation zellulärer Verbindungen. Zur Autoxidation neigen reduziertes Hämoglobin, reduziertes Ferredoxin, Leukoflavine, reduziertes Cytochrom c und Übergangsmetalle. Des Weiteren bildet eine Anzahl von Enzymen das Superoxidradikal als intermediären Metaboliten während der Katalyse. Zu diesen Enzymen zählen Oxidasen (z.B. Cytochrom-$P_{450}$-Oxidasen, Xanthinoxidasen, NADPH-Oxidasen, Aldehydoxidase), Lipoxygenasen, und Flavin-Dehydrogenasen. Das Superoxidradikal entsteht auch durch physikalische Einflüsse z.B. UV-Licht und Ultraschall, Pestizide, Tabak und Anästhetika (FRIDOVICH 1983, MACHLIN und BENDICH 1987, McCORD 2000, WU und CEDERBAUM 2003, ZUO et al. 2004).

In wässrigen Lösungen mit einem physiologischen pH-Wert kann das Superoxidradikal durch eine Zwei-Elektronen-Reduktion spontan zu Wasserstoffperoxid und elementarem Sauerstoff reagieren. Diese Reaktion wird durch Superoxiddismutasen katalysiert (HALLIWELL und GUTTERIDGE 1984, McCORD 2000). Wasserstoff-

peroxid hat kein ungepaartes Elektronenpaar und wird deshalb nicht als Radikal bezeichnet und es weist eine geringere oxidative Fähigkeit und höhere Stabilität als Radikale auf. Seine schädigende Wirkung ist darauf zurückzuführen, dass Wasserstoffperoxid in der Lage ist durch Zellmembranen frei zu diffundieren (HALLIWELL und GUTTERIDGE 1989, MILLER und BRITIGAN 1997) und Reaktionen mit Übergangsmetallen einzugehen, bei denen das reaktionsfreudige Hydroxylradikal entsteht (DIPLOCK 1981).

Das Hydroxylradikal reagiert mit Zucker, Aminosäuren, Nukleinsäuren, organischen Säuren und anderen wichtigen biologischen Molekülen (HALLIWELL und GUTTERIDGE 1989). Im Organismus entsteht das Hydroxylradikal durch die Reaktion mit Übergangsmetallen in der Haber-Weiss-Reaktion. Dabei wird die Reaktion des Superoxidradikals mit Wasserstoffperoxid durch die Elektronenübertragung von $Fe^{2+}$ oder $Cu^{2+}$ katalysiert. Es entsteht elementarer Sauerstoff, das Hydroxid-Ion ($OH^-$) und das Hydroxylradikal. Die hohe Reaktivität des Hydroxylradikals führt zu einer sofortigen Reaktion mit allen Zellkomponenten und bedingt seine zelltoxische Wirkung (DIPLOCK 1981, MICHIELS et al. 1994).

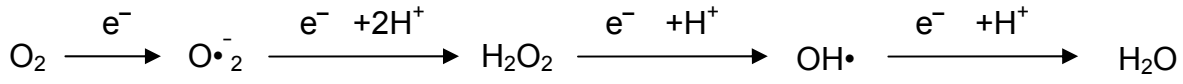



***Abbildung 7:*** *Sequentielle Reduktion von molekularem Sauerstoff (MARKANT et al. 1995)*

Eine Reihe organischer Sauerstoffradikale entsteht durch Sekundärreaktionen des Hydroxylradikals. Bei der Lipidperoxidation beispielsweise entstehen durch die metallkatalysierte Reaktion von Hydroxylradikalen mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren Alkoxyl- und Peroxylradikale. Diese Radikale können mit Wasserstoff reagieren und so die Kettenreaktion der Lipidperoxidation fortsetzen (HALLIWELL und GUTTERIDGE 1989, BUETTNER 1993).

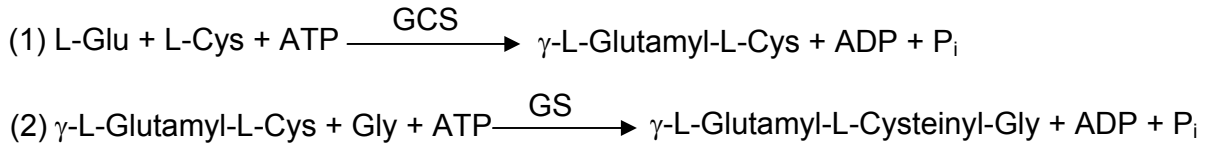
### 2.2.3 Antioxidative Schutz- und Kontrollmechanismen

Im Organismus dienen Antioxidanzien als Schutz- und Kontrollmechanismen des Redoxgleichgewichts. Nach HALLIWELL (1990) versteht man darunter eine Verbindung, die in niedrigen Konzentrationen vorliegt und zu einer signifikanten Verzögerung oder Hemmung der Oxidation einer oxidierbaren Substanz führt. Hierfür liegen sowohl enzymatische als auch nichtenzymatische Mechanismen vor.

*Glutathionmetabolismus*

Das Tripeptid Glutathion (L-γ-Glutamyl-L-Cysteinylglycin; GSH) ist das häufigste thiolhaltige Peptid in Säugetierzellen. In den meisten Zellen wird es speziesabhängig in Konzentrationen von ca. 1-10 mM vorgefunden und übernimmt eine entscheidende Rolle im Schutz der Zelle vor oxidativem Stress (HWANG et al., 1992GRIFFITH 1999). Weitere physiologische Funktionen des GSH umfassen: Speicherung und Transport von Cystein, Prostaglandin- und Leukotrienmetabolismus, zelluläre Redoxregulation, Signaltransduktion sowie Apoptose und Zellwachstum (MEISTER und ANDERSON 1983, DENEKE und FANBURG 1989, SIES 1999).

Die Synthese von GSH erfolgt intrazellulär in zwei Schritten durch die γ-Glutamylcysteinsynthetase (1) und die GSH-Synthetase (2). Hierbei kontrolliert das Endprodukt GSH selbst die GSH-Syntheserate mittels „feedbackinhibition“ über γ-Glutamylcysteinsynthetase in Reaktionsschritt (1) (MEISTER und ANDERSON 1983).




Als Peptid des antioxidativen Zellschutzes kann Glutathion spontan und nichtenzymatisch mit Hydroxylradikalen, Peroxynitritradikalen und Distickstofftrioxid reagieren (LUPERCHIO et al. 1996, KALYANARAMAN et al. 1996, BRIVIBA et al. 1999) und diese entgiften. Des Weiteren fungiert GSH als Substrat bei der enzymatischen Entgiftung von Wasserstoffperoxiden und Lipidperoxiden durch Glutathionperoxidasen. Bei diesem Reaktionszyklus wird GSH oxidiert und durch Glutathionreduktase (GR), NADPH-abhängig, erneut zu GSH reduziert. Die Peroxide bilden hierbei ihre korrespondierenden Alkohole (PAGLIA und VALENTINE 1967).

Die intrazelluläre Glutathionkonzentration kann durch zahlreiche Faktoren beeinflusst werden u.a. reaktive Sauerstoffspezies. Eine Verschiebung des GSSG/GSH Verhältnisses zugunsten von GSSG ist auf die spontane Reaktion mit Radikalen oder die katalysierte Reaktion mit selenabhängigen oder selenunabhängigen Glutathionperoxidasen zurückzuführen. Das Verhältnis zugunsten von GSH kann durch GSH-

Synthese oder im Falle der Glutathionperoxidasen mittels GR aufrechterhalten werden (DICKINSON und FORMAN 2002).
Der Einfluss eines Selenmangels, der mit einem Abfall der selenabhängigen Glutathionperoxidase und oxidativem Stress einhergeht, könnte also eine gesteigerte Glutathionsynthese (HILL und BURK 1982) oder eine Abnahme des GSSG am Gesamtglutathion nach sich ziehen (JENKINSON et al. 1987). Interessanterweise konnte in einigen Studien auch kein Einfluss eines Selenmangels auf den Glutathionmetabolismus in verschiedenen Organen beobachtet werden (BURK et al. 1978, XIA et al. 1985).
Des Weiteren beeinflusst auch eine exzessive Selenaufnahme den Glutathionmetabolismus. So kann der oxidativen Verschiebung des GSSG/GSH-Verhältnisses bei einer erhöhten Selenaufnahme durch erhöhte GR, Glucose-6-P-Dehydrogenase und γ-Glutamyltranspeptidase Aktivität entgegengewirkt werden (LeBEOUF und HOEKSTRA 1983, HOFFMAN et al. 1989).

*Glutathion-S-Transferasen*

Die erste Glutathionperoxidase (siehe 2.1.5.1) wurde 1953 in Erythrozyten entdeckt und konnte 1973 als selenhaltiges Enzym identifiziert werden. Die zelluläre Entgiftung von organischen Peroxiden und Wasserstoffperoxid katalysiert durch Glutathionperoxidasen unter Verwendung von GSH als Substrat konnte in den folgenden Jahren auch in anderen Geweben ermittelt werden. Ende der 70er Jahre lieferten zwei Arbeitsgruppen den Nachweis, dass diese Entgiftungsprozesse auf eine weitere selenunabhängige Enzymfamilie zurückzuführen waren. Die so genannten Glutathion-S-Transferasen (GSTs) katalysieren die Bildung von Thioethern aus Glutathion und einer Vielzahl reaktiver nukleophiler Verbindungen (z.B. Epoxide, organische Hydroperoxide und Alkenale). Im Gegensatz zu cGPx kommt als Reaktionspartner für GST Wasserstoffperoxid jedoch nicht in Frage (JAKOBY et al. 1976, LAWRENCE und BURK 1976, PROHASKA und GANTHER 1977).
Die GST-Enzymfamilie besteht aus drei Klassen cytosolischer Enzyme mit der Bezeichnung α, μ, π, die Mensch, Ratte und Maus eigen sind. Enzymatische Vergleichsstudien konnten zeigen, dass die αGSTs zu Cumolhydroperoxid, μGSTs zu Bromosulfophthalein oder 1,2-Dichloro-4-nitrobenzol und πGSTs zu Ethacrynsäure eine hohe Substratspezifität aufweisen (MANNERVIK et al. 1985). Trotz eines Unterschiedes in der spezifischen Aktivität von Faktor 3 reagieren alle GSTs mit 1-Chloro-

2,4-dinitrobenzol (CDNB) und machen diese chemische Verbindung zu einem geeigneten Substrat, um die zelluläre Bandbreite der GST-Aktivität zu ermitteln (HABIG und JAKOBY 1981). Die angesprochenen Substratunterschiede ermöglichen ebenso die Bestimmung ausgewählter GST-Klassen. RICCI et al. (1994) untersuchten 7-Chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl) als Substrat der GSTs und konnten beobachten, dass αGSTs eine hohe spezifische Aktivität gegenüber dieser Verbindung aufweisen.

Innerhalb der Glutathion-S-Transferasen kommt den αGSTs die entscheidende Rolle im Schutz der Zelle vor Lipidperoxidation zu. Denn neben Cumolhydroperoxid, einer nichtphysiologischen Verbindung, weisen die αGSTs die höchste Aktivität gegenüber Phospholipidhydroperoxiden und Cholesterolperoxiden auf (SINGHAL et al. 1992, HIRATSUKA et al. 1997, HURST et al. 1998, YANG et al. 2001). Der im Vergleich zu PHGPx niedrigeren Aktivität der αGSTs gegenüber den genannten Substraten steht jedoch ein hoher leberspezifischer Proteinanteil der GSTs von bis zu 3% des löslichen Gesamtproteins gegenüber (AWASTHI et al. 1994, HURST et al. 1998, ZHAO et al. 1999).

Veränderungen im Selenhaushalt im Sinne eines Mangels oder supranutritiver Selengaben führen zu erhöhter GST-Aktivität. Die erhöhte GST-Aktivität ist auf den Ausfall der cGPx im Selenmangel und das erhöhte Substratangebot für GSTs in Form von GSH zurückzuführen. Daher wird GSTs eine kompensatorische Wirkung im Selenmangel zugesprochen. Die Mechanismen, die auf einem supranutritiven Supplementationsniveau zu einem Anstieg der GST-Aktivität führen, konnten noch nicht eindeutig geklärt werden. Möglicherweise liegt hier bereits eine Adaption an toxische Bedingungen vor (LAWRENCE et al. 1978, STONE und DRATZ 1980, MASUKAWA et al. 1984, MEHLERT und DIPLOCK 1985, CHRISTENSEN et al. 1994). Der Einfluss von Selen auf die Genexpression von GSTs zeigt, dass Isoenzyme mit einer Peroxidaseaktivität sowohl im Selenmangel als auch bei supranutritiven Selengaben variabel reguliert werden. Die Induktion dieser GST-Isoenzyme könnte auf Ebene der Transkription oder prätranslational durch eine veränderte mRNA-Stabilität stattfinden (CHRISTENSEN et al. 1994, CHANG et al. 1990).

*Vitamin E und Vitamin C*

Ascorbinsäure (Vitamin C) ist ein wasserlösliches Antioxidanz, das besonders im extrazellulären Raum vorkommt (FREI 1989). L-Ascorbinsäure, Dehydroascorbinsäure und Semihydroascorbinsäure bilden als sehr reaktionsfähige Zwischenstufen ein Redoxsystem mit zweifacher Elektronenübertragung. Die Reaktion mit nahezu allen ROS und der Abbruch der Kettenreaktion bei der Lipidperoxidation machen Vitamin C zu einem bedeutenden Antioxidanz. Bei der Umwandlung von Dehydroascorbinsäure zu L-Ascorbinsäure sind andere enzymatische und nichtenzymatische Redoxsysteme beteiligt. So ist bekannt, dass Dehydroascorbinsäure durch die glutathionabhängige Dehydroascorbatreduktase zu L-Ascorbinsäure reduziert werden kann (BEYER 1994, PADAYATTY et al. 2003). Untersuchungen von MAY et al. (1997) haben gezeigt, dass auch das Selenoprotein Thioredoxinreduktase als NADPH-abhängige Dehydroascorbinsäurereduktase fungiert.

Das wichtigste lipidlösliche Antioxidanz ist Vitamin E (Derivate: α-, β-, γ-, δ-Tocopherol; α-, β-, γ-, δ- Tocotrienol). α-Tocopherol, die häufigste Form des Vitamin E im Organismus, ist ein Bestandteil der Lipidfraktion, insbesondere der Biomembranen (BURTON et al. 1983, PRYOR 2000). Vitamin E reagiert in erster Linie mit Lipidperoxylradikalen und schützt so ungesättigte Fettsäuren vor Lipidperoxidation. Des Weiteren entgiftet Vitamin E Superoxid- und Hydroxylradikale sowie andere ROS zu Wasserstoffperoxid, Wasser und organischen Säuren. Es wird dabei zum α-Tocopheryl-Radikal oxidiert. Das α-Tocopheryl-Radikal ist resonanzstabilisiert, weist nur eine geringe Reaktivität auf und führt so zu einem Abbruch der Reaktionskette. In einem zweiten Schritt wird das α-Tocopheryl-Radikal entweder durch Glutathion u.a. regeneriert oder nach der Reaktion mit einem weiteren Radikal aus dem Reaktionskreis durch die Bildung inaktiver Produkte ausgeschleust (BURTON 1990).

Zahlreiche Studien konnten eine synergistische Wirkung von Vitamin C und Vitamin E belegen. Unklar ist jedoch ob dieser Effekt *in vivo* durch die direkte Reduktion des α-Tocopheryl-Radikals zu α-Tocopherol durch Vitamin C zustande kommt oder ob mit einer verstärkten Entgiftung von ROS durch Vitamin C im Cytosol eine Vitamin E-„Einsparung“ einhergeht (HALPNER et al. 1998, HILL et al. 2003). Umgekehrt kann auch durch Vitamin E eine „Einsparung“ auf die Vitamin C-Konzentration beobachtet werden. Dies ist jedoch wahrscheinlich auf erhöhten oxidativen Stress im Cytosol

zurückzuführen, wenn ein Vitamin E-Mangel in der Lipiddoppelschicht der Biomembranen vorliegt (TANAKA et al. 1997).

### 2.2.4 Oxidative Schädigungsparameter und Folgereaktionen

*Schädigungsparameter*

Durch einen Mangel oder Überschuss an Selen wird oxidativer Stress hervorgerufen. Dies steht in direktem Zusammenhang mit der Bildung von ROS. Die Hauptangriffsgebiete freier Radikale und ROS sind Lipide, Proteine, Kohlenhydrate und DNA. Die verschiedenen Membranen tierischer Zellen bestehen überwiegend aus Proteinen und Lipiden. In dem folgenden Abschnitt soll auf die Mechanismen, Reaktionsprodukte und Folgen einer Modifikation dieser Verbindungen eingegangen werden.

*Lipidschädigung*

Der Angriff freier Radikale und reaktiver Sauerstoffspezies auf Lipide und die damit verbundenen Folgen für den Organismus wurden bis heute am intensivsten untersucht. Die Lipidperoxidation folgt den Teilschritten der Kettenreaktion wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben. Die Abstraktion eines Wasserstoffatoms an der zwischen zwei Doppelbindungen gelegenen $CH_2$-Gruppe modifiziert mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Biomembranen und führt zu der Bildung eines Lipidradikals. Bei der Reaktion dieses Radikals mit Sauerstoff entsteht ein Peroxylradikal, welches die Wasserstoffabstraktion bei einer weiteren ungesättigten Fettsäure induziert. Hierbei entstehen ein Lipidperoxid und ein weiteres Lipidradikal. Durch diese so genannte Kettenfortpflanzung entstehen autokatalytisch immer mehr Lipidperoxide (HALLIWELL und GUTTERIDGE 1989).

Die Lipidperoxidation verändert die Eigenschaften der Biomembranen nachhaltig. In erster Linie führen diese Veränderungen zu einer Depolarisation des Membranpotentials. Dies ist auf den Funktionsverlust von Ionenkanälen, -pumpen und Barriereeigenschaften der Biomembranen zurückzuführen. Des Weiteren kommt es zu einem allgemeinen Verlust der Zellfunktion durch oxidative Schädigung von Membranenzymen und -rezeptoren sowie Proteinen im Zellinneren (STARK 2005). Ein Anstieg der zellulären Hydroperoxidkonzentration beeinflusst außerdem die Aktivität von Enzymen des Arachidonsäuremetabolismus (Phospholipasen, Lipoxygenase, Cyclooxygenase), die an der Induktion inflammatorischer Prozesse beteiligt sind (SCHNURR et al. 1996, GIROTTI 1998, CHEN et al. 2003).

Bei dem Abbau dieser Lipidperoxide entstehen weitere reaktive Zwischenprodukte. So katalysieren Eisen und andere Übergangsmetalle die Reaktion von Lipidperoxiden zu Alkoxy- und Peroxyradikalen, welche die Lipidperoxidation forcieren. Ein Abbau der Radikale durch Spaltung der C-C-Bindung führt zu der Bildung von Aldehyden (Malondialdehyd, Alkanale, Alkenale, 4-Hydroxyalkenal) und Alkanen (Ethane und Pentane) als Sekundärprodukte der Lipidperoxidation (COMPORTI 1993).

Nachweismethoden konzentrieren sich daher auf diese Abbauprodukte. Einen unspezifischen Nachweis für Lipidperoxide liefern thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBA-RS). Hierbei reagieren die Carbonylverbindungen der Abbauprodukte mit 2-Thiobarbitursäure zu rotgefärbtem Trimethin. Da diese Abbauprodukte jedoch nicht allein bei der Lipidperoxidation entstehen, wird heute die Analyse von Isoprostanen als Abbauprodukte des nicht-enzymatischen Arachidonsäuremetabolismus diskutiert (GÜNTHER 1994, MONTUSCHI et al. 2004). Die Reaktionsprodukte der Lipidperoxidation weisen verbindungsabhängig eine zell- und genotoxische Wirkung auf. Dies ist auf deren Reaktionsfähigkeit mit Sulfhydryl- und Aminogruppen von Nukleinsäuren und Proteinen zurückzuführen (ESTERBAUER 1993, COMPORTI 1993).

*Proteinschädigung*

Neben Lipiden können auch Aminosäuren und Proteine durch Radikale oxidiert werden. Hierbei erfolgt eine Modifikation der Proteine durch die Reaktion mit Superoxid-, Hydroxyl-, Peroxyl- Alkoxyl- oder Hydroperoxylradikalen. Des Weiteren können Nicht-Radikale wie Hydroperoxide, Hypochlorsäure, Ozon und Peroxynitrit mit Proteinen reagieren. Dies führt zur Oxidation der Aminosäureseitenkette und Modifikation durch Proteinspaltung sowie zu intra- oder intermolekularen Proteinvernetzungen. Alle Aminosäurereste der Proteinkette sind anfällig für eine Oxidation und es kommt zu der Bildung verschiedenster Zwischenprodukte, die sich als Carbonyl- oder Nichtcarbonylverbindung charakterisieren lassen. Die aromatischen AS Phenylalanin, Histidin und Tryptophan sowie die Thiolgruppen von Methionin und Cystein reagieren empfindlich auf reaktive Sauerstoffspezies und bilden Nichtcarbonylverbindungen. Die direkte Oxidation der Proteinseitenkette führt bei Prolin, Arginin, Lysin und Threonin zu der Bildung von Aldehyden bzw. Ketonen. Des Weiteren können Carbonylreste in Proteinen bei der Reaktion von Lysin, Histidin und

Cystein mit Zwischenprodukten der Lipid- oder Kohlenhydratoxidation entstehen (BERLETT und STADTMAN 1997, STADTMAN und BERLETT 1997, REQUENA et al. 2003).

Die Bestimmung der Proteincarbonylkonzentration stellt daher eine Methode der unspezifischen Erfassung von Proteinschäden dar. So reagiert bei der von REZNICK und PACKER (1994) entwickelten Methode 2,4-Dinitrophenylhydrazin im sauren Milieu mit der Carbonylgruppe des veränderten Proteins zu einem gelbgefärbten Proteinhydrazon.

In vivo kann die oxidative Proteinschädigung negativen Einfluss auf die Funktion von Rezeptoren, Enzymen und Transportproteinen haben (siehe Lipidperoxidation). Die γ-Glutaminsynthetase (γGS) wurde in diesem Zusammenhang intensiv untersucht. Im Organismus katalysiert γGS die ATP-abhängige Reaktion von Ammoniak mit L-Glutamat zu L-Glutamin und dient somit der Ammoniakentgiftung in Gehirn Leber, Niere und anderen Organen.

Die ROS-bedingte Proteinmodifikation der γGS konnte in verschiedenen Studien durch enzymatische und nichtenzymatische Systeme induziert werden (NAKAMURA und STADTMAN 1984, NAKAMURA et al. 1985, STARKE-REED und OLIVER 1988). Die Anzahl von 16 Histidinresten je Untereinheit macht dieses Enzym besonders anfällig und LEVINE (1983) konnte in E. coli nachweisen, dass ein Aktivitätsverlust bereits nach der Oxidation eines Histidinrestes auftritt. Daher dient die Aktivität der γGS als spezifischer Nachweis einer Proteinoxidation, denn der Aktivitätsverlust ist direkt proportional zu dem Ausmaß der oxidativen Modifikation der anfälligen Hisitidinreste des Enzyms (LEVINE 1984).

Das Gleichgewicht zwischen Proteinoxidation und Proteinabbau wird u.a. mit rheumatoider Arthritis, Katarakt, Alzheimer und dem Alterungsprozess in Verbindung gebracht. Oxidierte Proteine werden intrazellulär leicht durch Proteasen abgebaut. Eine Akkumulation oxidierter Proteine ist daher auf eine Übersteigung der proteolytischen Kapazität, Aktivitätverlust oder Mangel an Proteasen zurückzuführen. Daher dient die Bestimmung oxidierter Proteine auch als Maß für den Protein-Turnover (FUCCI et al. 1983, STARKE-REED und OLIVER 1989, DEAN und DAVIES 1997).

*Folgereaktionen*

Die Produktion von ROS und die Verschiebung des Redoxgleichgewicht im oxidativen Stress sowie die daraus hervorgehende Schädigung von Lipiden, Proteinen, Kohlenhydraten und DNA führen zu Folgereaktionen im Gewebe. In dem folgenden Abschnitt soll daher die Apoptose als zentraler Prozess bei diesen Folgereaktionen beschrieben werden.

*Apoptose*

Apoptose oder der sogenannte programmierte Zelltod ist ein bedeutender physiologischer Prozess. Gemeinsam mit Zellwachstum und Zelldifferenzierung ermöglicht die Apoptose eine homöostatische Kontrolle der Zellzahl. Hierbei unterscheidet sich Apoptose deutlich von der Nekrose, einer anderen Form des Zelltodes. Die Nekrose führt zu Anschwellen und Ruptur der Zellmembranen sowie zu einer Lysis des Chromatins. Die größere Anzahl betroffener Zellen und die frühe Abgabe des Zellinhalts in den extrazellulären Raum bei einer nekrotischen Entwicklung ziehen heftige entzündliche Reaktionen nach sich. Bei einer Apoptose hingegen kondensiert Chromatin und eine Schädigung der Biomembranen erfolgt zu einem späteren Zeitpunkt als bei einer Nekrose. Die Beschränkung auf einzelne Zellen sowie die direkte Phagozytose betroffener Zellen führt zu keiner oder einer verhältnismäßig geringen Inflammation. Dennoch wird eine veränderte Apoptoserate heute mit einer Vielzahl von Erkrankungen in Verbindung gebracht. Eine herabgesetzte Apoptoserate mit inflammatorischen Prozessen und Krebs und eine erhöhte Apoptoserate mit degenerativen Erkrankungen (Alzheimer, Parkinson) und AIDS (SCHWARTZMAN und CIDLOWSKI 1993, SAIKUMAR et al. 1999, KANNAN und JAIN 2000).

Der programmierte Zelltod kann extrazellulär durch die Bindung von spezifischen Liganden (z.B. tumor necrosis factor $\alpha$; TNF$\alpha$) an sogenannten „death receptors“ (z.B. TNF-Rezeptor, Fas-Rezeptor) ausgelöst werden. Diese bilden in der Zelle mit verschiedenen cytosolischen Proteinen einen Komplex, der als aktive „death domain“ die Procaspase 8 proteolytisch aktiviert. Die Caspase 8 führt ihrerseits zu der Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6, 7, die zu einer Spaltung zahlreicher Zellverbindungen führen (z.B. DNA-Abbau, Proteolyse). Des Weiteren aktiviert die Familie der Caspasen zahlreiche Transkriptionsfaktoren. Zu diesen gehören die Proteine der Bcl-2-Familie, die pro- oder antiapoptotisch wirken. Das Protein Bax aus dem Cytosol lagert sich unter proapoptotischen Bedingungen an der

Mitochondrienmembran an und führt durch Konformationsänderungen zur Freisetzung von u.a. „apoptosis inducing factor“ (AIF), „apoptosis protease activating factor“ (Apaf-1) und Cytochrom c in das Cytosol, die wiederum Effektorcaspasen, DNA-Fragmentierung oder Chromatinkondensation beeinflussen und so die Apoptose forcieren (AFFORD und RANDHAWA 2000, KANNAN und JAIN 2000, SAIKUMAR et al. 1999).

Oxidativer Stress verursacht die Zerstörung von zellulären Strukturen durch die Reaktion von ROS mit Lipiden, Proteinen und DNA. Diese Veränderungen können intrazellulär ebenfalls zu einer nichtrezeptor-initiierten Apoptose über den mitochondrialen Reaktionsweg (siehe oben) führen. Des Weiteren wird p53, ein Tumorsupressorprotein, und der c-Jun-N-terminale-Kinase-(JNK)-Reaktionsweg in Zusammenhang mit Apoptose gesehen, die durch oxidativen Stress vermittelt wird. Im Zellkern kann p53 die Transaktivierung von apoptosezugeordenten Genen (u.a. proapoptotische Gene der Blc-2-Familie) vermitteln oder direkt an antiapoptotische Proteine dieser Familie binden und diese inhibieren. Dies induziert den Caspasereaktionsweg (HUSSAIN und HARRIS 2006).

Die proapoptotische Aktivität der JNK ist ebenfalls auf die Induktion apoptotischer Faktoren zurückzuführen. Hierzu gehört die Regulation von Genen der Blc-2 Familie, die durch Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien die oben beschriebenen Reaktionswege nach sich ziehen und zur Apoptose führen (SHEN und LIU 2006).

Die Wirkung von Selen in adäquaten Konzentrationen auf die Apoptose wird vor allem auf die antiapoptotische Wirkung von Selenoproteinen als Antioxidanzien und Regulatoren des Zellredoxgleichgewichtes zurückgeführt. Dies ist bei der Familie der Glutathionperoxidasen vor allem auf die Entgiftung von Hydroperoxiden zurückzuführen (KAYANOKI et al. 1996, HOEHN et al. 2003, DEMELASH et al. 2004, NAKAGAWA 2004, TANG et al. 2005). Denn dies verhindert die Reaktion von ROS mit Zellstrukturen, deren Schädigung apoptotische Reaktionswege induziert. Die TrxR Familie beeinflusst direkt oder durch die Bereitstellung reduzierten Thioredoxins eine Vielzahl Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen in der Zelle, die wiederum für die Aufrechterhaltung des Redoxgleichgewicht verantwortlich sind. Die Funktion von apoptoseregulierenden Transkriptionsfaktoren wie p53 sowie der JNK-Reaktionsweg (siehe 2.1.5.4) werden durch dieses TrxR-Trx-System gesteuert (SAITOH et al. 1998, TURUNEN et al. 2004, SHEN und LIU 2006). Die proapoptotischen Mechanismen,

die bei erhöhten Selenkonzentrationen in verschiedenen Zelllinien beobachtet werden können, werden auf die Bildung von Selenmetaboliten und hohen ROS-Konzentrationen zurückgeführt (siehe 2.1.7).

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Ziel des Versuches, Versuchsplan und -parameter

Die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden mit dem Ziel konzipiert, den Einfluss verschiedener anorganischer Selenverbindungen anhand einer adäquaten bzw. supranutritiven Selenzulage auf die differenzielle Genexpression in der Leber am Modelltier Ratte zu untersuchen. Als Kontrolle diente in beiden Versuchen eine Selenmangelgruppe. Die Diäten wurden, mit Ausnahme von Selen, nach den Fütterungsempfehlungen des National Research Council (NRC 1995) der U.S.A zusammengestellt. Um einen Einfluss durch einen kombinierten Selen/Vitamin E-Mangel auszuschließen, wurde der native Vitamin E-Gehalt der Diäten analysiert und berechnet. Der Vitamin E-Gehalt der Versuchsdiäten erfüllte die Mindestanforderungen von 18 I.E./kg Diät für wachsende Ratten (NRC 1995).

***Tabelle 3:*** *Versuchsdesign der beiden Rattenversuche*

| **Tierzahl (n)** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Versuch 1 (V1) | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| Versuch 2 (V2) | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| **Gruppe** | **0** | **I** | **II** | **III** | **IV** | **V** | **VI** |
| Se [mg/kg Diät] als $Na_2SeO_3$ | - | 0,2 | - | 1,0 | - | 2,0 | - |
| Se [mg/kg Diät] als $Na_2SeO_4$ | - | - | 0,2 | - | 1,0 | - | 2,0 |

In zwei Versuchen erhielten insgesamt 112 Ratten die Versuchsdiäten über einen Zeitraum von acht Wochen, um einen alimentären Selenmangel zu erzeugen und eine adäquate bzw. supranutritive Selenversorgungslage (fünffacher bzw. zehnfacher Bedarf) zu schaffen.

Neben den erfassten zootechnischen Parametern sollten im Anschluss an das Microarray-Screening gezielt verschiedene Selenoenzyme, antioxidative Schutzmechanismen und Zellschädigungsparameter auf molekulargenetischer Ebene und Proteinebene untersucht werden (Tab. 4).

***Tabelle 4:*** *Versuchsparameter von Versuch 1 und 2*

| Parameter | Versuch 1 | Versuch 2 |
|---|---|---|
| ***Zootechnische Parameter*** | | |
| Futteraufnahme | ✓ | ✓ |
| Lebendmasseentwicklung | ✓ | ✓ |
| Futterverwertung | ✓ | ✓ |
| ***Selengehalt*** | | |
| Versuchsdiät | ✓ | ✓ |
| Leber | ✓ | ✓ |
| Plasma | ✓ | ✓ |
| ***Microarray-Screening*** | ✓ | |
| ***Zellschutzparameter*** | | |
| Cytosolische Glutathionperoxidase (cGPx) | ✓ | ✓ |
| Plasmatische Glutathionperoxidase (pGPx) | ✓ | ✓ |
| Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase (PHGPx) | | ✓ |
| Cytosolische Thioredoxin Reduktase (TrxR1) | ✓ | |
| Mitochondriale Thioredoxin Reduktase (TrxR2) | ✓ | |
| Glutathion-S-Transferasen (GST) | ✓ | ✓ |
| $\alpha$–Glutathion-S-Transferasen ($\alpha$GST) | | ✓ |
| Glutathion | ✓ | ✓ |
| Glutathionreduktase | ✓ | ✓ |
| ***Zellschädigungsparameter*** | | |
| Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBA-RS) | ✓ | |
| Proteincarbonyle | ✓ | |
| $\gamma$-Glutaminsynthetase ($\gamma$GS) | ✓ | |

## 3.2 Zusammensetzung und Herstellung der Versuchsdiäten

Die Futterkomponenten für die Versuchsdiäten wurden unter der Vorgabe ausgewählt, eine selenarme Basisdiät zu erstellen. Die Hauptkomponenten bildeten Torulahefe als Proteinträger sowie Maisstärke und Saccharose als Kohlenhydratträger. Der Rohnährstoff- und Energiegehalt der Diät wurde an die Empfehlungen des NRC (National Research Council, U.S.A.) für wachsende Ratten angelehnt. Unter Berücksichtigung der nativen Nährstoffgehalte der Futterkomponenten wurden Mineralstoffe, Vitamine und Aminosäuren ergänzt.

***Tabelle 5:*** *Zusammensetzung der Basisdiät*

| **Basisdiät** | |
|---|---|
| Komponente | Anteil (%) |
| Torulahefe[a] | 30 |
| Cellulose BWW 40[b] | 5 |
| Saccharose | 10 |
| Sojaöl | 3 |
| Kokosfett | 2 |
| Met/Cys[c] | 0,3 |
| Mineralstoffvormischung[d] | 3,5 |
| Vitaminvormischung[e] | 1 |
| Cholinchlorid[f] | 0,2 |
| Maisstärke[g] | 45 |
| Summe | 100 |

[a]Torulahefe, min. 50% XP, Fa. Attisholz, Luterbach (CH)

[b]Cellulose BWW 40

[c] DL-Methionin, Fa. Degussa, Hanau

[d]Mineralstoffvormischung (Angaben je kg Diät): 7,02 g $CaCO_3$; 1,815 g $K_3C_6H_5O_7*H_2O$; 2,17 g $MgSO_4*7H_2O$; 2,43 g NaCl; 144 mg $FeC_6H_5O_7$; 29 mg $MnSO_4*H_2O$; 123,7mg $ZnSO_4*7H_2O$; 0,028 mg $CuSO_4*5H_2O$; 0,245 mg KI; 0,259 mg $(NH_4)_6Mo_7O_{24}*4\ H_2O$; 9,0 mg $KCr(SO_4)_2*12\ H_2O$; 2,07mg NaF; 47,43 mg $Na_2SiO_3x9H_2O$; 0,573 mg LiCl; 2,68 mg $H_3Bo_3$; 2,10 mg $NiSO_4*6H_2O$; 0,22 mg $NH_4VO_3$

[e]Vitaminvormischung (Angaben je kg Diät): 4000 IE Retinol; 1000 IE Cholecalciferol; 0,9 mg Menadion; 5,0 mg Thiamin; 6 mg Riboflavin; 6 mg Pyridoxin; 0,025 mg Cobalamin; 0,2 mg Biotin; 2,0 mg Folsäure; 30 mg Nicotinsäure; 15 mg Pantothensäure

[f] Cholinchlorid, Fa. Roche, Basel (CH)

[g] Maisstärke, Fa. Roquette Fre´res, Lestrem (F)

Die Zusammenstellung der Diäten erfolgte in einem Präzisionsmischer von DIERCKS UND SÖHNE. Die pulverförmigen Komponenten der Basisdiät wurden in einen Mischer gegeben und 10 min gründlich gemischt. Der Anteil der reinen Maisstärke wurde in diesem Schritt so bemessen, dass die selenat- oder selenithaltigen Stärkevormischungen, je nach Höhe der Selenzulage in der Diät, gegen die Maisstärkekomponente der Basisdiät ausgetauscht wurden. Das Sojaöl und geschmolzenes Kokosfett wurden zuletzt hinzugegeben. Die Diät wurde weitere 10 min gemischt und dann in eine Pelletierpresse der Firma SIMON HEESEN (Niederlande) gegeben und mit aufgesetzter Stahlmatrize mit 10 mm Bohrung schonend pelletiert. Die Diäten wurden bis zu ihrer Verfütterung bei 4°C gelagert.

## 3.3 Herkunft, Haltung der Versuchstiere, Durchführung der Versuche

Für die achtwöchigen Fütterungsversuche wurden 63 (Versuch 1) bzw. 49 (Versuch 2) wachsende männliche Albinoratten (institutseigener Stamm: HK 51) mit einem durchschnittlichem Anfangsgewicht von 62,8g ± 3,97 g (Versuch 1) bzw. 60,47g ± 0,09 g (Versuch 2) herangezogen und zufällig sieben Versuchsgruppen mit je 9 Tieren (Versuch 1) bzw. mit je 7 Tieren (Versuch 2) zugeteilt. Die Ratten wurden einzeln in Makrolonkäfigen mit Einstreu unter standardisierten Bedingungen (22°C, 55% Luftfeuchtigkeit, 12h-Hell-Dunkel-Rhythmus) gehalten. Die Fütterung erfolgte ad libitum und die Tiere hatten freien Zugang zu entmineralisiertem Wasser. Die Kontrolle der Futteraufnahme sowie der Gewichtsentwickelung erfolgte einmal wöchentlich nach zwölfstündiger Nüchterung. Am Versuchsende wurden die Tiere nach Erfassung der zootechnischen Parameter durch Kohlendioxid betäubt, dekapitiert und ausgeblutet. Die entnommenen Organe wurden mit 0,9%-iger NaCl-Lösung gespült, um eventuelle Blutreste zu entfernen, und in Trockeneis schockgefrostet. Bis zu ihrer analytischen Verwendung wurden die Organe und das Blut bei -80°C im Tiefkühlschrank gelagert.

## 3.4 Analytische Methoden

### 3.4.1 Energie-, Mineral- und Rohnährstoffgehalt der Versuchsdiäten

Der Rohnährstoffgehalt der Diäten wurde nach den amtlichen Methoden des VDLUFA (NAUMANN und BASSLER 1997) ermittelt.

Die Extraktion des Rohfettes mit n-Hexan wurde nach der Hydrolyse mit Salzsäure durchgeführt. Die Analyse des Stickstoffgehaltes erfolgte nach der Dumas-Verbrennungsmethode (Elementar, Vario Max CN). Rohprotein wurde aus N x 6,25 errechnet. Als Rohfaser wurde der Rückstand nach dem Kochen der Probe mit verdünnter Schwefelsäure und Kalilauge bezeichnet. Hierbei wurde bei der Aufbereitung der Probe eine Aluminiumoxidschicht bei der Filtration eingesetzt. Der Energiegehalt (Bruttoenergie) der Diäten wurde in einem adiabatischen Bombenkalorimeter ermittelt (IKA-Kalorimeter C400).

Die Gehalte an Ca, Mg, P, Fe, Cu, Zn und Mn wurden mit Hilfe der induktiv gekoppelten Plasmaatomemissions-Spektroskopie (ICP-AES-System) ermittelt, um die korrekte Zugabe der Mineralstoffvormischung und die Einhaltung der NRC-Vorgaben für Laborratten zu überprüfen. Hierzu wurden die Futterproben bei 450°C für 15 h trockenverascht und in 3M $HNO_3$ gelöst.

### 3.4.2 Selengehalt in den Versuchsdiäten und in der Leber

Die Selenkonzentrationen in den Versuchsdiäten sowie in Leber und im Plasma wurden nach einer modifizierten Methode von WELZ et al. (1985), mittels „hydride generation-atomic absorption spectrometry“ (HG-AAS) mit kontinuierlicher Fließinjektion, bestimmt.

Bei diesem Verfahren wurden die Proben (1 g Leber, 5 g Diät oder 0,5 g Plasma) zunächst mit 65%-iger $HNO_3$ und 30%-iger $H_2O_2$ versetzt und mikrowellenunterstützt aufgeschlossen. Hierbei werden sowohl organisch gebundenes Selen als auch anorganische Selenverbindungen zu Selenat (+VI) oxidiert.

Es folgen zwei Reduktionsschritte: Im ersten Schritt wird Selenat der Oxidationsstufe +VI zu Selenit (+IV) reduziert. Hierzu wird die gewonnene Aufschlusslösung nach Zugabe von 1,4 M Amidoschwefelsäure und 37%-iger HCl 60 min bei 70°C im Wasserbad inkubiert. Der zweite Reduktionsschritt erfolgt unmittelbar vor der Messung im AAS. Hierfür versetzt das vorgeschaltete Fließinjektionssystem des AAS einen aliquoten Anteil des selenit(+IV)haltigen Aufschlusses mit einer 0,2%-iger Natriumborhydridlösung (in 0,05%-iger NaOH). Das so gebildete Se-II-Hydrid wird daraufhin mittels Argonstrom in eine durch Luft-Acetylenflamme auf 700°C erhitzte Quarzküvette transportiert. Für die Bestimmung des atomisierten Selens wird eine Absorptionslinie bei 196 nm herangezogen.

### 3.4.3 Aufarbeitung der Organproben

#### 3.4.3.1 Zytoplasmahomogenate

Als Analysenmaterial für einen hohen Anteil der nachfolgenden enzymatischen Bestimmungen diente der Zytoplasma-Überstand aus Organhomogenaten. Die Herstellung der Organhomogenate erfolgte durch die Abtrennung von ca. 0,5 g des Organs auf einem Uhrglas und die Einwaage in ein Zentrifugenröhrchen, das je nach Analyse mit einem Puffer auf eine Verdünnung von 1:10 (1:5) (weight/volume) aufgefüllt wurde. Mit einem Dispergiergerät der Firma MICCRA (MICCRA RT, Art Miccra D-8) wurde die Probe bei 39.000 $min^{-1}$ dispergiert. Das so gewonnene Rohhomogenat wurde bei -80°C gelagert. Für die Gewinnung des Zytoplasmahomogenates wurde die Probe aufgetaut, kurz aufgeschüttelt und bei 4°C-10°C für 15 (bzw. 30) min in einer Kühlzentrifuge (SORVALL INSTRUMENTS RC5C) bei 12.000 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das cytosolische Homogenat zwischen der schwimmenden Fettschicht und dem Sediment entnommen und in 2 ml Cups abpipettiert.

#### 3.4.3.2 Mitochondrienisolat

Lediglich die Bestimmung der mitochondrialen Thioredoxinreduktase (TrxR2) erfolgte nicht in zytoplasmatischen Homogenaten, sondern in Organhomogenaten, welche nach differenzieller Zentrifugation die Mitochondrienfraktion enthielten.

Die Herstellung der Organhomogenate mit der Mitochondrienfraktion erfolgte durch die Abtrennung von ca. 0,5 g der Leber auf einem Uhrglas und die Einwaage in ein Zentrifugenröhrchen, das mit einem Phosphatpuffer (50 mM Natriumphosphat-Puffer) auf eine Verdünnung von 1:10 (w/v) gebracht wurde. Mit einem Dispergiergerät der Firma MICCRA (MICCRA RT, Art Miccra D-8) wurde die Probe bei 10.500 $min^{-1}$ dispergiert.

Im Anschluss wurden die Homogenate einer differenziellen Zentrifugation (Heraeus LABOFUGE 400R) unterzogen. Im ersten Schritt erfolgte eine Zentrifugation bei 600 x g (10 min bei 2°C). Der Überstand mit der Mitochondrienfraktion wurde in Cups überführt und bei 13.000 x g (15 min bei 2°C) erneut zentrifugiert. Der Überstand nach der zweiten Zentrifugation wurde verworfen und das entstandene Mitochondrienpellet mit 1,5 ml Arbeitspuffer (PBS-Puffer zur TrxR-Bestimmung) versetzt, aufgewhirlt und erneut für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet mit 500 µl PBS-Arbeitspuffer versetzt und homogen aufgewhirlt. Dieses Homogenat wurde zur Bestimmung der TrxR2 eingesetzt.

### 3.4.4 Selenabhängige Enzyme

Nach Aufbereitung der Organproben (siehe 3.4.3) wurden die Enzymaktivitäten der Selenoenzyme photometrisch ermittelt. Um die spezifische Enzymaktivität zu erhalten, wurden die Ergebnisse auf den nach der Methode von BRADFORD (1976) bestimmten Proteingehalt der Probe bezogen.

#### 3.4.4.1 Cytosolische Glutathionperoxidase (cGPx)

Die cytosolische Glutathionperoxidase (cGPx) wurde modifiziert nach der Methode von PAGLIA und VALENTINE (1967) bestimmt. Als Peroxidase katalysiert die cGPx die Reduktion von Wasserstoffperoxid ($H_2O_2$) zu zwei Molekülen Wasser. Hierbei wird der an der Reaktion beteiligte Protonendonator Glutathion (GSH) zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert. Durch die anschließende NADPH-abhängige Regeneration von GSSG durch die Glutathionreduktase wird der Reaktion stets eine ausreichende Menge an GSH zur Verfügung gestellt.

Für die Bestimmung der cGPx-Aktivität in der Rattenleber wurden die Homogenate in einem Phosphatpuffer (25 mM $Na_2HPO_4$; 25 mM $KH_2PO_4$, pH 7,5) dispergiert und entsprechend verdünnt. Unmittelbar vor Beginn der Messung wurde der GPx-Assaypuffer, bestehend aus dem Phosphatpuffer (50 mM Phosphat; 5 mM EDTA), 13,3 mM $NaN_3$; 50 mM GSH; 10 mM NADPH und 15 U/ml GR zusammengestellt. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden 480 µl Assaypuffer mit 10 µl der verdünnten Probe versetzt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10µl $H_2O_2$ (5,0 mM) gestartet. Für den Blindwert wurde statt der Probe Phosphatpuffer eingesetzt. Da NADPH im Gegensatz zu NADP bei einer Wellenlänge von 340 nm ein Absorptionsmaximum besitzt, kann die Abnahme von NADPH photometrisch gemessen werden. Die Beobachtung erfolgte über einen Zeitraum von 3 min mit einer Messung im Abstand von 15 sec. Die Abnahme der NADPH-Konzentration verhält sich proportional zur GPx-Aktivität. Die Aktivität wurde mit der folgenden allgemeinen Formel berechnet:

$$\text{mU/mg Protein} = \frac{(\Delta E \times V \times VF) \times 1000}{\varepsilon \times d \times v \times \text{Protein [mg/ml]}}$$

ΔE: Extinktion
V: Gesamtvolumen
v: Probenvolumen
VF: Verdünnungsfaktor
ε: Extinktionskoeffizient
d: Schichtdicke der Küvette

Hierbei entspricht 1 U dem Umsatz von 1 µmol NADPH/min. Die Enzymaktivität wurde auf den Proteingehalt der Probe bezogen und in mU/mg Protein angegeben.

#### 3.4.4.2 Plasmatische Glutathionperoxidase

Die plasmatische Glutathionperoxidase (pGPx) wurde analog der in Kapitel 3.4.4.1 beschriebenen Methode analysiert. Es wurden 10 µl unverdünntes Plasma eingesetzt.

#### 3.4.4.3 Thioredoxinreduktase (TrxR)

Die Aktivitätsbestimmung der Thioredoxinreduktase (TrxR) erfolgte mittels eines DTNB [5,5-Dithiobis(2-nitrobenzoat)]-Reduktionsassays, modifiziert nach HILL et al. (1997) und GROMER et al. (1998).

Als Bestandteil aller lebenden Zellen besteht die Hauptaufgabe der TrxR darin, in Abhängigkeit von NADPH, die Reduktion von Thioredoxin zu katalysieren. Der DTNB-Reduktionsassay nutzt den Umstand aus, dass alle bisher bekannten Thioredoxinreduktasen mit einem Gewicht von ca. 55 kDa pro Untereinheit das artifizielle Disulfidsubstrat in Abhängigkeit von NADPH zu 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB) reduzieren können.

Für die Bestimmung der TrxR in der Rattenleber wurde der Überstand der in PBS-Puffer (phosphate-buffered saline: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM $Na_2HPO_4$, 1,5 M $KH_2PO_4$, pH 7,3) dispergierten Rohhomogenate (1:10) abgenommen und in Dialyseschläuche gefüllt. Das Homogenat wurde unter Rühren 24 h lang einer Dialyse gegen PBS-Puffer bei ca. 4°C unterzogen, um endogenes Glutathion (GSH) zu entfernen. Anschließend wurden die Homogenate aus den Dialyseschläuchen entnommen und bei 55°C für 10 min inkubiert. Durch die folgende Kühlung und Zentrifugation bei 15.000 g konnten die hitzeinstabilen, ausgefällten Proteine abgetrennt werden. Der TrxR-enthaltende Überstand konnte für den DTNB-Reduktionsassay eingesetzt werden.

Die Messung der Absorptionszunahme durch die Bildung des TNB erfolgte bei 412 nm über einen Zeitraum von 2 min. Hierzu wurden 100 µl des Überstandes mit 875 µl TrxR-Assaypuffer (100 mM Kalium-Phosphat-Puffer, 2 mM EDTA, pH 7,4) und 30 µl DTNB (100 mM) in eine Halbmikroküvette gegeben und gemischt. Durch die Zugabe von NADPH (4 mM) wurde die Reaktion gestartet. Für den Blindwert wurde statt NADPH Kalium-Phosphat-Puffer eingesetzt.

Die Aktivität der TrxR wird rechnerisch über den NADPH-Verbrauch kalkuliert. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass pro umgesetztem Molekül NADPH zwei Moleküle TNB entstehen, d.h. die Absorptionsänderung muss durch den Faktor zwei geteilt werden.

$$\text{mU/mg Protein} = \frac{(\Delta E \times V \times VF) \times 1000}{2 \times \varepsilon \times d \times v \times \text{Protein}\,[\text{mg/ml}]}$$

ΔE: Extinktion
V: Gesamtvolumen
v: Probenvolumen
VF: Verdünnungsfaktor
ε: Extinktionskoeffizient
d: Schichtdicke der Küvette

#### 3.4.4.4 Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase (PHGPx)

Die Aktivität der Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase (PHGPX) wurde mittels einer modifizierten Methode nach MAIORINO et al. (1990) und WEITZEL et al. (1990), LEI et al. (1995) bestimmt.

Als Peroxidase katalysiert die PHGPx die Reduktion von Phospholipid- und Cholesterolperoxiden zu Alkoholderivaten und Wasser. Hierbei wird der an der Reaktion beteiligte Protonendonator Glutathion (GSH) zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert. Durch die anschließende NADPH-abhängige Reduktion von GSSG durch die Glutathionreduktase wird der Reaktion eine ausreichende Menge an GSH zur Verfügung gestellt.

Die Aktivität der PHGPx wurde in (1:5 w/v) Rattenleberhomogenaten bestimmt, welche durch Dispersion der Leber in einem Saccharosepuffer (0,25 M Saccharose, 20 mM TRIS-HCl, 0,1% Triton-X-100) hergestellt worden waren.

Die Ermittelung der Absorptionsänderung durch die Abnahme von NADPH erfolgte bei einer Wellenlänge von 340 nm und einer Temperatur von 25°C. Hierzu wurden 760 µl $H_2O_{bidest}$ mit 200 µl Assaypuffer II (0,5 mM NADPH, 15 mM GSH gelöst in 10 ml Assaypuffer I: 0,5 M TRIS-HCl, 25 mM EDTA, 5 mM $NaN_3$), 10 µl Triton-X-100 (20%), 10 µl GR (1,2 x $10^5$ U/L) und 10 µl des Leberhomogenates versetzt und 3 min inkubiert. Nach Messung der Ausgangsextinktion (1. Messung) nach 3 min wurden 20 µl PCOOH (50µM Phosphatidylcholinhydroperoxid) als Substrat hinzupipettiert und die NADPH-Abnahme, welche der PCOOH-Reduktion proportional ist, über 3 min gemessen. Die spezifische Extinktionsänderung der PHGPx wird durch Abzug der Basisextinktion (1. Messung) von der NADPH-Oxidationsrate nach Zugabe des Substrates ermittelt und nach einer allgemeinen Formel berechnet (siehe 3.4.4.1).

PCOOH als Substrat für den PHGPx-Assay wurden durch die Oxidation von L-α-Phoshatidylcholin hergestellt. Hierzu wurden 40 mg L-α-Phoshatidylcholin in 16 ml Desoxycholsäure-Natriumsalz-Lösung (3%) gegeben und mit 100 ml Natriumborat (0,2 M, pH 9,0) verdünnt. Anschließend wurde die Reaktion, unter Durchfluss von 99% $O_2$, durch Zugabe von 40 µl Lipoxygenase (100 kU) gestartet. Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C gerührt und in vier Intervallen weitere 160 µl Lipoxygenase hinzugesetzt. Daraufhin wurde der Reaktionsansatz auf eine Sep-Pak $C_{18}$-Säule gegeben, welche mit 4 ml Methanol und 40 ml $H_2O_{bidest}$ equilibriert worden war. Die

Säule wird nach Durchfluss der PCOOH-haltigen Lösung erneut mit 20 ml $H_2O_{bidest}$ gewaschen und das PCOOH mit 2 ml Methanol eluiert.

Die Konzentration des gewonnenen Substrates wurde mit Hilfe des iodometrischen Assays (DARROW et al. 1994) bestimmt. Diese Methode beruht auf der Bildung von $I_3^-$ (Extinktionsmaximum 365 nm) bei dem Umsatz von Lipidhydroperoxiden mit Kaliumiodid. Hierzu wurden zu 200 µl des in MeOH gelösten PCOOH 400 µl $H_2O_{bidest}$ pipettiert und dieser Ansatz mit 500 µl des Farbreagenzes (9,3 ml 1 M $K_2HPO_4$, 30,7 ml 1 M $KH_2PO_4$, 1,5 ml 0,02 M $NaN_3$, 4,0 ml 10% Triton-X, 2,0 ml 1% Benzalkonium-chlorid, 4,0 ml 0,5 mM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}*4H_2O$ ad 100 ml $H_2O_{bidest}$; 40 mg KI pro ml Farbreagenz) versetzt. Das Proben-Farbreagenz-Gemisch wurde anschließend bei 50°C für 30 min inkubiert und die Extinktion bei 365 nm ermittelt. Die Konzentration des Substrates wurde über eine Cumolhydroperoxid-Eichkurve ermittelt, deren Standards (50 µM-600 µM) einer identischen Behandlung unterzogen worden waren.

## 3.4.5 Zellschutzparameter

### 3.4.5.1 Gesamtglutathion und oxidiertes Glutathion

Die enzymatische Bestimmung des Gesamtglutathiongehalts und des Gehaltes an oxidiertem Glutathion beruht auf einer Methode von THIETZE (1969) und GRIFFITH (1980). Bei dieser Bestimmung überträgt reduziertes GSH seinen Sulfhydrylgruppen-Wasserstoff auf das Substrat 2,2-Dinitro-5,5-dithio-dibenzoesäure (DTNB), welches als Farbreagenz fungiert. Gleichzeitig bildet Glutathion seine Disulfidform (GSSG) aus. Das entstandene GSSG wird durch die Glutathionreduktase (GR) unter NADPH-Verbrauch zu GSH reduziert und kann erneut mit DTNB reagieren.

Die Konzentrationen der Reagenzien in diesem Ansatz wurden so gewählt, dass die Umsetzung von DTNB dem GSH-Gehalt der Probe angepasst ist. Dies ermöglicht, die Extinktionszunahme pro Zeiteinheit zu ermitteln und anhand einer Eichgeraden die Konzentrationen an GSSG zu bestimmen.

Der Gehalt an reduziertem Glutathion lässt sich aus der Differenz zwischen Gesamtglutathion und GSSG errechnen. Um den Anteil an oxidiertem Glutathion zu bestimmen, muss dem Reaktionssystem durch Derivatisierung mit 2-Vinylpyridin GSH entzogen werden. Das entstehende GSH-Vinylpyridinderivat ist weder in der Lage mit DTNB zu reagieren, noch kann es durch GR zu GSH reduziert werden. Die Extinktionsänderung wurde bei 412 nm über einen Zeitraum von 3 min bei Raumtemperatur gemessen. Hierzu wurden die Proben zunächst mit Puffer A (150 mM

$Na_2PO_4$-$KH_2PO_4$-Puffer, pH 7,4) verdünnt und Sulfosalicylsäure (10 w/v%) im Verhältnis 1:2 hinzupipettiert, gut gemischt und 5 min auf Eis inkubiert, um das enthaltene Protein auszufällen. Im Anschluss wurde das Protein 10 min in einer gekühlten Eppendorfzentrifuge bei Vollleistung (14.000 x g) abzentrifugiert. Daraufhin wurden 540 µl des Überstandes (Standard 1-5, Leerwert, Probe) abgenommen und mit 40 µl Puffer A und 60 µl Triethanolamin (50 v/v%) gründlich vermischt und bis zu der enzymatischen Messung gekühlt aufbewahrt. Für die Derivatisierung wurden die 40 µl Puffer A gegen 40 µl 2-Vinylpyridin ausgetauscht. Die mit Vinylpyridin versetzten Proben wurden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die enzymatische Bestimmung wurden 350 µl NADPH (0,28 mM), 50 µl DTNB (6 mM in Puffer C (125 mM $Na_2PO_4$-$KH_2PO_4$-Puffer, pH 7,5) und 75 µl Probe/ Standard/ Leerwert in eine Halbmikroküvette vorgelegt und die Reaktion durch die Zugabe von 25 µl GR (10 U/ml in Puffer C) gestartet.

Die Standards der Eichreihe wurden durch Verdünnen einer frisch angesetzten GSSG-Stammlösung (200 µg/ml in Puffer A) hergestellt. Die Konzentrationen der Standards lagen zwischen 0 und 20 µg/ml. Die Standards wurden den gleichen Schritten, wie in der Bestimmung des GSSG beschrieben, unterzogen.

#### 3.4.5.2 Glutathionreduktase

Die Bestimmung der Glutathionreduktase-Aktivität erfolgte nach einer von COHEN und DUVEL (1988) entwickelten Methode. Die Glutathionreduktase (GR) ist eine Disulfidreduktase. Sie reduziert die Disulfidform des Glutathions (GSSG) zur Sulfhydrylform (GSH) unter Umsetzung von NADPH. Aufgrund der unterschiedlichen Absorptionsmaxima von NADPH und NADP ist es möglich, die Extinktionsabnahme von NADPH spektralphotometrisch zu beobachten. Die Konzentrationsabnahme verläuft proportional zur Enzymaktivität und wird über den Zeitraum von 1 Minute erfasst.

Die Messung der Absorptionsabnahme wurde photometrisch bei 340 nm durchgeführt. Hierzu wurden 850µl GSSG-Lösung (1,18 mM GSSG in 100 mM Natriumphosphat, pH 7,0 und 1,5 mM EDTA) mit 100 µl NADPH (1,0 mM) in eine Halbmikroküvette zusammengegeben und gründlich vermischt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl Leberhomogenat gestartet. Bei der Messung des Blindwertes wurde die Organprobe durch den Verdünnungspuffer TRIS (10 mM, pH 7,4) ersetzt. Die Methode wurde anhand einer Standardkurve evaluiert. Hierzu dienten die Verdünnungen (25 mU - 150 mU) einer Glutathionreduktase-Stammlösung (20 mU/µl

GR). Die Enzymaktivität wurde anhand einer allgemeinen Gleichung berechnet (siehe 3.4.4.1). Hierbei entspricht 1U der Oxidation von 1 μmol NADPH/min.

#### 3.4.5.3 Glutathion-S-Transferasen

Die Glutathion-S-Transferasen (GSTs) wurden nach einer von HABIG und JAKOBY (1981) entwickelten Methode bestimmt. GSTs katalysieren eine Vielzahl von Reaktionen, in denen Glutathion als Nukleophil reagiert. Bei der Konjugation von Glutathion mit dem Substrat 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol kann direkt eine Änderung der Absorption beobachtet und so die Aktivität der GSTs erfasst werden.

Zunächst wurden die Leberproben (1:10 TRIS-Puffer) mit TRIS-Puffer (10 mM, pH 7,4) auf eine Verdünnung von 1:500 gebracht. Die Absorptionszunahme wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Hierzu wurden in einer 1,5 ml Küvette folgende Reagenzien zusammengegeben: Nach Vorlage von 790 μl Kalium-Phosphat-Puffer wurden 100 μl GSH (10 mM) und 10 μl 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (100 mM in Ethanol 99%) hinzupipettiert und bei 25°C temperiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μl der Probe gestartet. Bei der Messung des Blindwertes wurde die Probe durch 100 μl K-P-Puffer ersetzt.

Die Aktivität der GSTs wurde anhand einer Eichkurve ermittelt. Aus einem Glutathion-S-Transferase-Standard (19 U/g) wurden Verdünnungen hergestellt (20, 40, 60, 80 und 100 mU) und deren Extinktion bei der Reaktion mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol bestimmt. Mit Hilfe der erstellten Geradengleichung konnte die Konzentration der Proben durch Einsetzen der Extinktionen berechnet werden. Unter idealen Bedingungen (pH 6,8 und 25°C) entspricht 1 U Enzymaktivität 1 μmol Substratumsatz pro Minute, d.h. die Änderung der Extinktion ist proportional zu der Enzymaktivität. Da die Angabe der Enzymaktivität in U/mg Protein erfolgt, muss das Ergebnis durch den Proteingehalt der Probe dividiert werden.

#### 3.4.5.4 α-Glutathion-S-Transferasen

Die Aktivität der α-Glutathion-S-Transferasen (αGSTs) wurde nach einer Methode von RICCI et al. (1993) bestimmt. Als Untereinheiten der Familie der Glutathion-S-Transferasen wird ihnen ein hoher Anteil der Glutathionperoxidase-Aktivität im Organismus zugesprochen. Bei der Konjugation von Glutathion mit dem Substrat 7-Chlor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl), welches für αGSTs eine hohe Spezifität aufweist, entsteht eine stabile gelbe Verbindung. Die darauf folgende Ab-

sorptionsänderung kann erfasst werden und so die Aktivität der αGSTs errechnet werden.

Die Bestimmung der αGSTs in der Rattenleber erfolgte nach einem Dialyseschritt um Glutathion, welches spontan mit dem verwendeten Substrat reagiert, aus den Proben zu entfernen. Hierzu wurde der Überstand der in Kaliumphoshat-Puffer (K-P-Puffer) dispergierten Rohhomogenate (1:5) abgenommen und in Dialyseschläuche gefüllt. Das Homogenat wurde unter Rühren 24 h lang einer Dialyse gegen K-P-Puffer bei ca. 4°C unterzogen. Die so dialysierten Proben konnten für den NBD-Cl Assay eingesetzt werden.

Zunächst wurden die dialysierten Leberproben mit Kalium-Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 6,5) auf eine Verdünnung von 1:1000 gebracht. Die Absorptionszunahme wurde bei einer Wellenlänge von 419 nm für 3 min in 15 Sekunden Intervallen gemessen. Hierzu wurden in einer 1,5 ml Küvette folgende Reagenzien zusammengegeben: Nach Vorlage von 415 µl Natriumacetatpuffer (0,1 M, pH 5,0) wurden 50µl der verdünnten Probe mit 25 µl NBD-Cl (4 mM in 96% Ethanol) versetzt und auf 25°C temperiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl GSH (25 mM) gestartet. Bei der Messung des Blindwertes wurde GSH durch 10 µl Natriumacetatpuffer ersetzt, um mögliche Spontanreaktionen des Substrates zu erfassen.

Die Zunahme des konjugierten NBD-Cl verhält sich proportional zu der αGST-Aktivität. Die Aktivität wurde mit einer allgemeinen Formel berechnet (siehe 3.4.4.1).

Hierbei entspricht 1 U der Bildung von 1 µmol 7-Glutathionyl-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol/min. Die Enzymaktivität wurde auf den Proteingehalt der Probe bezogen und in mU/mg Protein angegeben.

## 3.4.6 Zellschädigungsparameter

### 3.4.6.1 Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBA-RS)

Die bei der Lipidperoxidation entstehenden Carbonylverbindungen reagieren mit 2-Thiobarbitursäure zu einem rotgefärbten Trimethin. Erhöhte TBA-RS-Gehalte sind ein Anhaltspunkt für Störungen in der enzymatischen Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies. Der TBA-RS-Gehalt der Proben wurde nach einer modifizierten Methode von GÜNTHER et al. (1994) bestimmt. Zunächst wurden die Leberproben in einem TRIS-HCl-Puffer (10 mM, pH 7,4) 1:10 verdünnt. Zur weiteren Aufbereitung wurden 850 µl der Verdünnungen mit 850 µl 5% Trichloressigsäure (TCA)-Lösung versetzt, aufgeschüttelt und für 4 min bei 13000 x g zentrifugiert. Nach der erfolgten

Ausfällung und Abzentrifugation des Proteins wurden 500 µl der Leberprobe mit 500 µl 1% Thiobarbitursäure (TBA)-Lösung und 50 µl 0,5 % BHT-SDS versetzt und in Rundbodenreagenzgläser, die vorher mit TBA und Phosphorsäure ausgekocht wurden, pipettiert. Im Anschluss wird der Ansatz auf 100°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Die Extraktion des Farbstoffes erfolgt nach Abkühlen des Ansatzes durch die Zugabe von 3 ml Butanol. Der Farbkomplex wird anschließend durch 3-minütiges Schütteln extrahiert. Die Phasentrennung erfolgt durch anschließende Zentrifugation für 15 min bei 3112 x g. Der in Butanol extrahierte Farbstoff wird fluorometrisch bei 532 nm bestimmt. Die Konzentration der Proben wird mit Hilfe einer TEP-Eichkurve (Tetraethoxypropan) ermittelt. Die angesetzten Standards mit Konzentrationen von 0,33 nM bis 2,64 µM wurden einer identischen Behandlung unterzogen. Die Gehalte an TBA-RS wurden in nmol/g FM angegeben.

#### 3.4.6.2 Gamma-Glutaminsynthetase

Die γ-Glutaminsynthetase (γGS) katalysiert im Organismus die ATP-abhängige Reaktion von Ammoniak mit L-Glutamat zu L-Glutamin. Sie dient somit der Ammoniakentgiftung in Gehirn, Leber, Niere und anderen Organen.

Oxidativer Stress und somit das vermehrte Auftreten von Sauerstoffradikalen kann auch zu einer oxidativen Schädigung von Proteinen führen. Der Aktivitätsverlust der γGS kann als Schädigungsparameter für zelluläre Proteine verwendet werden.

Der γ-Glutamyltransferaseassay wurde nach einer modifizierten Methode nach MILLER et al. (1978) durchgeführt. Die Bestimmung der γGS findet hierbei unter nicht physiologischen Substratbedingungen statt.

Bei einem Überschuss an Glutamin und Hydroxylamin entsteht γ-Glutamin-Hydroxamsäure, die in Anwesenheit von Eisen-(III)-Ionen einen rotbraunen Komplex bildet. Die Konzentration dieses Eisenkomplexes kann photometrisch gemessen werden und somit die Aktivität der γGS indirekt bestimmt werden.

Zunächst wurden die Leberproben 1:10 in TRIS-Puffer (pH 7,4) verdünnt. 100 µl dieser Verdünnung wurden mit 400 µl Imidazol-HCl (125 mM, pH 6,8), 100 µl Hydroxylamin (0,5 M), 100 µl L-Glutamin (1 M), 100 µl Kaliumarsenat (0,25 M), 100 µl ADP (2 mM) und 100 µl Manganchlorid (5 mM) versetzt. Dieser Ansatz wurde gründlich geschüttelt und 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wird die Reaktion mit einer Eisenchlorid-Trichloressigsäure-HCl-Lösung gestoppt. Das ausgefällte Eiweiß wird für 5 min bei 3112 x g abzentrifugiert und im Überstand

wird die Extinktion der Probe, nach einem Abgleich des Photometers gegen Luft, bei 505 nm bestimmt.
Die Konzentration der Proben wird mit Hilfe einer Glutamin-Hydroxamat Eichkurve ermittelt. Die angesetzten Standards mit Konzentrationen von 10 μM bis 1000 μM wurden einer identischen Behandlung unterzogen. Unter idealen Bedingungen (pH 6,8 und 37°C) entspricht 1U Enzymaktivität 1μmol Substratumsatz pro Minute, d.h. die Änderung der Extinktion ist proportional zur Enzymaktivität. Da die Angabe der Enzymaktivität in U/mg Protein erfolgt, muss das Ergebnis durch den Proteingehalt der Probe dividiert werden.

### 3.4.6.3 Proteincarbonyle

Das vermehrte Auftreten von Sauerstoffradikalen wird als eine entscheidende Ursache für die oxidative Schädigung von Proteinen im Organismus angesehen. Die oxidative Modifikation der Aminogruppe einzelner Aminosäurereste zu einer Carboxylgruppe (-CO) führt zur Bildung von so genannten Proteincarbonylen.
Die Konzentration der Proteincarbonyle in der Leber wurde nach einer Methode von REZNICK und PACKER (1994) bestimmt. Hierbei reagiert 2,4-Dinitrophenylhydrazin im sauren Milieu mit der Carbonylgruppe des veränderten Proteins zu einem gelbgefärbten Proteinhydrazon.

$$\text{Protein - C = O} \xrightarrow{\text{H2N - NH - 2,4 - DNP}} \text{Protein = N – NH – 2,3 – DNP} + H_2O$$

Im ersten Schritt wurden die Leberproben mit einem proteaseinhibitor-enthaltenden Natriumphosphat-EDTA-Puffer (50 mM, 1 mM, pH 7,4 mit 8 mg PMSF, 1 mg Leupeptin, 1,4 mg Pepstatin A, 1 mg Aprotinin und 200 mg Digitonin je 200 ml Homogenisationspuffer) auf eine Verdünnung von 1:10 gebracht und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.
Nach dem Auftauen wurde zunächst 1 ml dieses Homogenates mit 4 ml TRIS-Puffer (10 mM, pH 7,4) verdünnt (1:50) und 500 μl dieser Verdünnung wurden entweder als Probe mit 4 ml DNPH (10 mM in 2,5 N HCl) oder als Blindwert mit 2,5 N HCl versetzt und eine Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA 20%) und eine 10 minütige Inkubation auf Eis. Das Protein wurde bei Raumtemperatur (RT) 10 min bei 12000 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Proteinpellet wurde erneut mit TCA

(10%) versetzt und abzentrifugiert (siehe oben). Um DNPH und Lipidrückstände zu beseitigen, wurde das Pellet dreimal mit einer Mischung aus Ethylacetat und Ethanol (1/1) gewaschen und nach jedem Waschschritt abzentrifugiert (10 min bei 12000 bzw. 18000 x g). Zu dem so gewonnenen Proteinpellet wurden 2 ml Guanidin-HCl Lösung gegeben (6 M Guanidin-HCl in $KH_2PO_4$-Puffer, pH 2,3) und bei 37°C für 10 min inkubiert. Die Bestimmung der Proteincarbonylkonzentration des Pellets erfolgte bei 360 nm. Die Proteinkonzentration der Proben wurde bei 286 nm durch die Messung der Extinktion der Blindwerte gegen Guanidin-HCl-Lösung bestimmt.

### 3.4.7 Succinatdehydrogenase

Die Succinatdehydrogenase (SDH) ist ein Enzym der inneren Mitochondrienmembran und somit ein Bestandteil der Atmungskette. Das Enzym oxidiert in vivo Succinat zu Fumarat und überträgt dabei Reduktionsäquivalente auf Ubichinon. Durch ihr Vorkommen als Bestandteil der inneren Mitochondrienmembran kann die Aktivität der SDH als Mitochondrienmarker verwendet werden. Die Aktivität der SDH wurde in dieser Arbeit nach einer Methode von VEEGER et al. (1969) bestimmt und als Marker bei der Bestimmung der mitochondrialen TrxR eingesetzt. Hierbei überträgt SDH Reduktionsäquivalente auf Dichlorophenol-Indophenol (DCPIP), welches zu einer Extinktionsabnahme von DCPIP bei 600 nm führt. Die Reaktion ist proportional, da 1 Mol Succinat 1 Mol DCPIP reduziert.

Zunächst wurden die Mitochondrienisolate mit PBS-Puffer (siehe 3.4.4.3) auf eine Verdünnung von 1:10 gebracht. Die Absorptionsabnahme wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Hierzu wurden in einer 1,5 ml Küvette folgende Reagenzien zusammengegeben: 1,25 ml Reaktionspuffergemisch (1,2 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,6; 50 µl 30 mM KCN neutralisiert; 5 µl 15 mM DCPIP) mit 1,25 mg Bovinem Serum Albumin, 150 µl 0,4 M Succinat-Lsg. pH 7,6, 50 µl 1% Phenazinmethosulfat-Lsg. und 50 µl Probe. Dieser Ansatz wurde gut gemischt die DCPIP-Reduktion für 3 min gemessen. Das Photometer wurde gegen Luft kalibriert und zu jeder Probe ein Probenleerwert bestimmt. Die Aktivität wurde anhand der allgemeinen Gleichung für Enzymaktivitäten ermittelt (siehe 3.4.4.1) und auf mg Protein bezogen.

### 3.4.8 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Proben wurde nach einer von BRADFORD (1976) entwickelten Methode bestimmt. Diese Bestimmung nutzt den Umstand aus, dass der Farbstoff

Coomassie Brilliant Blue zwei Farben aufweist. Die rote Farbe wird in die blaue Farbe überführt, wenn der Farbstoff an Protein bindet. Der Protein-Farbstoff-Komplex besitzt einen hohen Extinktionskoeffizienten, welcher der Methode eine hohe Sensibilität bei der Proteinbestimmung verleiht.

Der Proteingehalt der Proben wurde anhand einer Eichgeraden ermittelt. Hierzu wurde eine Proteinstammlösung bestehend aus reinem Rinderalbumin (0,05 g reines Rinderalbumin in 100 ml 10 mM TRIS-HCl-Puffer, pH 7,4) hergestellt und Verdünnungen zwischen 0 und 50 µg/100 µl eingestellt.

Für die Herstellung des Proteinreagenz wurde Coomassie Brilliant Blue (100 mg) in 95%-iger Ethanol (50 ml) gelöst und mit 85%-iger Phosphorsäure (100 ml) versetzt. Die entstandene Lösung wurde mit $H_2O_{bidest}$ auf ein Volumen von einem Liter gebracht und über einen Blaubandfilter filtriert.

Bei der Proteinmessung wurden in einer Makroküvette 50 µl der Probe (Standard/Leerwert: TRIS-HCl) mit 2,5 ml Bradfordreagenz versetzt und nach ca. 10-20 min wurde die Extinktion bei 595 nm gegen den Blindwert photometrisch bestimmt. Mit Hilfe der aus der Eichgeraden erstellten Geradengleichung, konnte die Konzentration der Proben durch Einsetzen der Extinktionen berechnet werden.

### 3.4.9 Differenzielle Genexpression in der Leber

Die differenzielle Genexpression in der Leber wurde für Versuch 1 und 2 für fünf Tiere je Versuchsgruppe durchgeführt, die anhand ihres annährend gleichen Gewichts ausgesucht worden waren. Hierzu wurden die Gewebeproben bereits bei der RNA-Isolation „gepoolt“.

#### 3.4.9.1 Microarray

Um den Einfluss unterschiedlicher Dosierungen anorganischer Selenverbindungen auf die differenzielle Genexpression der Ratte zu untersuchen, wurde mit Hilfe des MWG Rat 10K Arrays (MWG-BIOTECH AG, Ebersberg) ein Screening durchgeführt. Auf dem MWG Rat 10K Array befanden sich die cDNA-Bereiche von 9715 Genen der Ratte. Die GenBank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) diente als Informationsquelle für die cDNA-Sequenzen, die auf diesen Microarrays verwendet wurden.

Die Aufarbeitung sowie der DNase I Verdau der RNA-Proben wurden am Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie, Gießen, durchgeführt. Die anschließenden Schritte der Markierung, Hybridisierung und Auswertung erfolgten bei

der Firma MWG-BIOTECH AG (siehe Anhang). Die hier verwendeten Zweikanal Microarrays boten die Möglichkeit, die unterschiedlich markierten cDNAs zweier Versuchsgruppen zu kombinieren und auf einem Array unter kontrollierten Versuchsbedingungen gemeinsam zu hybridisieren. Hierzu wurden zwei Fluoreszenzfarbstoffe (Cy3, Cy5) zur Detektion verwendet, die in zwei verschiedenen Kanälen ausgelesen wurden. Folgende Cohybridisierung der Versuchsgruppen wurde durchgeführt:

***Tabelle 6:*** *Cohybridisierung der Microarrays*

| **Microarray Nr.** | **Gruppe** | **Markierung** (Farbstoff) | kombiniert mit | **Gruppe** | **Markierung** (Farbstoff) |
|---|---|---|---|---|---|
| 81 | **0** | Cy3 | + | **I** | Cy5 |
| 82 | **0** | Cy3 | + | **II** | Cy5 |
| 83 | **0** | Cy3 | + | **III** | Cy5 |
| 84 | **0** | Cy3 | + | **IV** | Cy5 |
| 85 | **I** | Cy3 | + | **II** | Cy5 |
| 86 | **III** | Cy3 | + | **IV** | Cy5 |

#### 3.4.9.2 Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials

Die RNA-Extraktion wurde nach dem Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Verfahren von CHOMCZYSKI und SACCHI (1987) durchgeführt.

In ein zwei ml Eppendorf Cup mit einer Vorlage von 600 µl RNase-hemmenden Guanidinthiocyanat-Puffer wurden 100 mg Gewebe (20 mg pro Tier) gegeben und bei 39000 U vollständig dispergiert (MICCRA RT, Art Miccra D-8).

***Tabelle 7:*** *Ansatz des Guanidinthiocyanat-Puffers*

| Substanz | Menge für 100 ml Puffer | Endkonzentration |
|---|---|---|
| Guanidinthiocyanat | 47,25 g | 4 M |
| 1 M Tri-Natriumcitrat-2-hydrat | 2,5 ml (1 M Stammlösung) | 25 mM |
| N-Lauroyl-Sarcosin | 0,5 g | 0,5% (w/v) |
| ß-Mercaptoethanol | 720 µl (gesätt. Stammlösung) | 0,1 M |
| | | ad 100 ml $H_2O_{DEPC}$ |

Daraufhin wurden unter dem Abzug 60 µl Natriumacetat-Lösung (2 M, pH 4,0), 600 µl gesättigte Phenollösung und 225 µl (49: 1) Chloroform-Isoamylalkohol hinzupipettiert. Die Cups wurden dann sorgfältig verschlossen und eine Minute auf einem Schüttler gemischt. Im Anschluss wurden die Proben für 30 Minuten auf Eis gestellt und anschließend erneut kurz aufgemischt und in der Kühlzentrifuge 40 min bei 2°C und 5000 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation sind drei Phasen erkennbar:

| | |
|---|---|
| oben: | wässrige Guanidinthiocyanat-Phase mit gelöster RNA |
| mitte: | Interphase mit Proteinen |
| unten: | phenolhaltige Phase mit weiteren organischen Bestandteilen |

600 µl der oberen RNA-haltigen Phase wurden in ein neues Cup pipettiert und 600 µl Isopropanol als Fällungsmittel zugefügt. Die Cups wurden sorgfältig verschlossen, geschüttelt und über Nacht im Tiefkühlschrank bei -20°C untergebracht. Die Sedimentation des Pellets erfolgte durch Zentrifugation bei 2°C für 30 min und 14000 x g. Anschließend wurde das Pellet zweimal mit 70% Ethanol (1 ml) gewaschen, und nach dem letzten Waschschritt 1,5 h in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und im Anschluss unter vorsichtigem Whirlen in $H_20_{DEPC}$ gelöst.
Die Messung der RNA-Konzentration sowie der Reinheit erfolgte photometrisch im UV-Bereich bei 260 bzw. 280 nm. Hierzu wurden 2,5 µl der gelösten RNA in eine Halbmikroküvette mit einer Vorlage von 1000 µl $H_20_{DEPC}$ pipettiert und gründlich gerührt. Die Konzentration wurde durch die Messung der Extinktion bei 260 nm gegen den Leerwert ermittelt und errechnet sich wie folgt:

$$\text{µg RNA/ µl Lösung} = \frac{\text{Extinktion der Probe}_{260} \text{ x VF x } 40}{1000}$$

VF gibt die Verdünnung der RNA-Lösung in der Messanordnung an.

z.B.

$$\text{VF} = \frac{(1000 \text{ µl } H_20_{DEPC} + 5 \text{ µl RNA-Präparation})}{5 \text{ µl RNA-Präparation}}$$

Neben der Ermittelung der RNA-Konzentration gibt der Quotient der Extinktion bei 260 und 280 nm Aufschluss über die Reinheit der RNA-Präparation.

#### 3.4.9.3 Bestimmung der RNA-Qualität durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Qualität der isolierten RNA wurde über den Lauf in einem Agarosegel (1,5%, 1 x TAE-Puffer) unter denaturierten Bedingungen mit Aliquoten der Probe ermittelt.

Entsprechend den Extinktionsmessungen der RNA-Proben wurden Verdünnungen ($H_20_{DEPC}$) mit einer Konzentration von 2 µg/µl eingestellt, um eine Anpassung der Probenvolumina an gleiche RNA-Mengen zu erreichen. Die saubere elektrophoretische Separation der RNA wurde durch Denaturierung erreicht. Diese ist erforderlich, um die Bildung sekundärer Strukturen durch intramolekulare Basenpaarungen zu verhindern und so die vorgesehene Auftrennung auf dem Agarosegel anhand der tatsächlichen Größe zu gewährleisten. Die Denaturierung der RNA (7 µg) erfolgte durch die Zugabe von 2,0 µl 50 x TAE-Puffer (0,8 M TRIS, 0,4 M Natriumacetat, 20 M EDTA, pH 7,4 mit konz. Essigsäure), 3,5 µl Formaldehyd und 2,0 µl Formamid sowie die darauf folgende Erhitzung des Ansatzes auf 70°C für 10 min in einem PCR-Cycler (MyCycler, Biorad).

Der Denaturierungsansatz wurde nach der Erhitzung auf Eis heruntergekühlt und 4 µl Ladepuffer (50% Glycerin (w/w), 1mM EDTA, 0,25% Bromphenolblau (w/w)) sowie 1,5 µl Ethidiumbromid hinzupipettiert. Der Ladepuffer hat die Aufgabe, die Dichte der RNA-Lösung zu erhöhen und so ein Absinken im Gelslot zu gewährleisten. Die Anfärbung der Proben erleichtert außerdem das Einfüllen der RNA in die Geltasche und der Farbstoff Bromphenolblau markiert im Gel die Lauffront. Ethidiumbromid interkaliert mit der RNA, d.h. es lagert sich zwischen die Basen der RNA. So ist es der RNA möglich, nach der Anregung mit UV-Licht (335 nm) zu fluoreszieren. Die Intensitäten werden in einem Fluorimeter ermittelt.

Die Qualität der RNA wurde anhand der Intensität der Banden und des Vorhandenseins genomischer DNA bestimmt. Hierbei sollten die 28S und 18S rRNA-Banden deutlich zu erkennen sein und die Intensität im Verhältnis 2:1 stehen. Eine Degradation der RNA ist möglich, wenn die Banden verschmiert sind oder die 18S Bande intensiver fluoresziert als die 28S Bande. Eine Verunreinigung mit genomischer DNA ist an fluoreszierenden Fragmenten in den Gelslots zu erkennen, da DNA-Fragmente länger sind als RNA wandern sie deutlich langsamer im Gel.

#### 3.4.9.4 Desoxyribonuclease I Verdau

Um Störungen der Reversen Transkription durch DNA-Verunreinigungen zu vermeiden, wurden die Proben nach der Qualitätskontrolle einem Desoxyribonuklease-

(DNase I)-Verdau unterzogen. Die Vorschrift der Firma MWG wurde den Versuchsbedingungen angepasst.

Hierzu wurde 1 mg Gesamt-RNA in 150 µl $H_2O_{DEPC}$ gelöst (~6,6 µg/µl) und mit 40 µl $MgCl_2$ (20 mM), 22 µl TRIS-HCl-Puffer (200 mM) sowie 2 µl DNase I (Fermentas; 50 U/µl) versetzt und für 20 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 214 µl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) zu dem Ansatz pipettiert, dieser gründlich gemischt und bei 5000 x g (1 min, 4°C) zentrifugiert. 200 µl der oberen wässrigen Phase wurden in ein Eppendorfcup überführt und 200 µl Chloroform hinzugegeben. Nach erneutem Mischen und Zentrifugieren (5000 x g, 1 min, 4°C) wurden wiederum 150 µl der wässrigen Phase abpippetiert und mit 30 µl Ammoniumacetat (5 M) und 300 µl 96%igem Ethanol versetzt. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei -20°C gelagert.

Daraufhin erfolgte die Sedimentation des Pellets. Hierzu wurden die Proben für 15 min bei 4°C und 14000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet einmal mit 70%igem Ethanol (1 ml) gewaschen, erneut zentrifugiert (14000 x g, 7 min, 4°C) und 1,5 h in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Im Anschluss wurde das Pellet unter whirlen in $H_20_{DEPC}$ gelöst und eine Endkonzentration von 8 µg/µl eingestellt. Die eingestellte Konzentration der RNA-Lösung wurde photometrisch (siehe 3.4.9.2) bei 260 nm überprüft.

## 3.4.10 RT-PCR

### 3.4.10.1 Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials

Die Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials erfolgte analog der in Kapitel 3.4.9.2 beschriebenen Methode von CHOMCZYSKI und SACCHI (1987).

### 3.4.10.2 Bestimmung der RNA-Qualität durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Bestimmung der RNA-Qualität erfolgte wie in Kapitel 3.4.9.3 beschrieben.

### 3.4.10.3 Reverse Transkription

#### 3.4.10.3.1 Biorad (iScript™cDNA Synthesis Kit*)*

Die reverse Transkription wurde mit Hilfe eines Kits der Firma Biorad (iScript™cDNA Synthesis Kit) durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die RNA-Proben nach Herstellerempfehlung auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt, um eine Anpassung der Probenvolumina an gleiche RNA-Mengen zu erreichen. Durch die Inkubation der RNA mit einer modifizierten MMLV (Molony murine leukemia virus)

Reversen Transkriptase und einer herstellerspezifischen Mischung von Oligo (dT)- sowie Hexamerprimern wurde die komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Hierzu sah das Reaktionsprotokoll der Firma Biorad eine Inkubation von 5 min bei 25°C, 30 min bei 42°C und 5 min bei 85°C vor.

#### 3.4.10.3.2 Fermentas (RevertAid$^{TM}$First Strand cDNA Synthesis Kit)

Die reverse Transkription wurde mit Hilfe eines Kits der Firma Fermentas durchgeführt. Nach Herstellerempfehlung wurden 5 μg RNA in dem Reaktionsansatz eingesetzt. Hierzu wurden die RNA-Proben auf eine Konzentration von 2 μg/μl eingestellt, um eine Anpassung der Probenvolumina an gleiche RNA-Mengen zu erreichen. Die eingestellten RNA-Proben wurden daraufhin mit Oligo(dT)- Primern (bzw. Random Hexamer Primern) und $H_2O_{DEPC}$ versetzt und bei 70°C 5 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben gekühlt und mit einem 5 x Reaktionspuffer des Herstellers sowie einem Ribonukleaseinhibitor und dNTP-Mix versetzt. Nach einer weiteren Inkubation für 5 min bei 37°C (bzw. 25°C für 5 min) wurde die RNA mit einer modifizierten MMLV (Molony murine leukemia virus) Reversen Transkriptase versehen und die komplementäre DNA (cDNA) wurde synthetisiert. Hierzu sah das Protokoll eine Inkubationszeit von 42°C für 60 min (bzw. 25°C für 10 min und 42°C für 60 min) und eine finale Erwärmung der Proben für 10 min bei 70°C vor, um die Reaktion zu beenden.

Daraufhin wurden die Proben (Biorad und Fermentas) auf 4°C abgekühlt und mit 40 μl $H_20_{DEPC}$ (Verdünnung 1:3) versetzt. Anschließend wurde deren Konzentration bei 260 nm photometrisch bestimmt. Die Endkonzentration der Proben von 0,5 μg cDNA/μl ermöglicht somit den Einsatz von 2 μl cDNA-Lösung (1 μg cDNA) in dem Polymerase-Kettenreaktion-(PCR)-Ansatz. Diese Einsatzmenge erlaubt eine Amplifizierung der cDNA in der PCR über die Zahl von ca. 20-30 Zyklen.

### 3.4.10.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde erstmals von MULLIS (SAIKI et al. 1985) beschrieben. Heute wird diese Methode in einer Vielzahl von Variationen in Medizin und Naturwissenschaft eingesetzt.

Die cDNA-Sequenzen in der GenBank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) dienten als Grundlage bei der Ermittelung der Primer, die in dieser Arbeit verwendet wurden (Primer aus Literaturquellen wurden gekennzeichnet). Das

Primer3 Programm von ROZEN und SKALETSKY (2000) erstellte die Primer nach Vorgaben, die eine optimierte DNA-Amplifikation ermöglichen. Dem Primerdesign lagen folgende Kriterien zugrunde: Die Primer sollten 19-21 Bp lang sein, eine Schmelztemperatur zwischen 59 und 60°C haben und einen GC% von 45-55 erfüllen (SCHEINERT et al. 1995). Eine Überprüfung der Primer auf ihre Speziesspezifität sowie auf Homologien zu unerwünschten Genen erfolgte durch das BLASTN-Programm des NCBI, welches die ausgewählten Primer mit allen bekannten Sequenzen verglich. Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

***Tabelle 8:*** *Primer, Annealingtemperatur und Zyklenzahl*

| Name | Primer | Sequenz ( 5´-3´) | Fragmentgröße (Bp) | $T_a$ (°C) | Zyklenzahl | Akzessionsreferenz/ Quelle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| cGPx | fw<br>rev | TCA TTG AGA ATG TCG CGT CT<br>CCC ACC AGG AAC TTC TCA AA | 388 | 55,0 | 25, 27, 29 | NM 030826<br>Primer3 |
| PHGPx | fw<br>rev | ATG CAC GAA TTC TCA GCC AAG<br>GGC AGG TCC TTC TCT AT | 461 | 57,0 | 28, 30, 32 | NM 017165<br>KANG et al. 2004 |
| TrxR1 | fw<br>rev | CCT ATG TCG CCT TGG AAT GT<br>TGT AAG GCA CAT TGG TCT GC | 390 | 55,3 | 29,31,33 | NM 031614<br>Primer3 |
| TrxR2 | fw<br>rev | GGC ACC TTT GAC ACT GTC CT<br>CGA TCT GCC ACT GTG AAC TC | 404 | 57,4 | 27,29,31 | NM 022584<br>Primer3 |
| αGST | fw<br>rev | CAG GAG TGG AGT TTG ATG AGA<br>AGA GGG AAA GAG GTC AGA AG | 463 | 56,0 | 25, 27, 29 | NM 0170131<br>GÒMEZ-LECHON et al. 1998 |
| GAPDH | fw<br>rev | ACG GGA AGC TCA CTG GCA TG<br>CCA CCA CCC TGT TGC TGT AG | 303 | 59,4 | 26 | NM 0170081<br>Primer3 |
| β-Actin | fw<br>rev | TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA<br>TCT CAG CTG TGG TGG TGA AG | 396 | 57,4 | 26, 28 | NM 0311441<br>Primer3 |

Die Amplifikation der cDNA wurde wie folgt durchgeführt. Die Reaktionskomponenten wurden zu einem Mastermix zusammengestellt. Der Mastermix für 10 Reaktionen enthielt je 15 µl Primer (10 µM), 22,8 µl dNTP´s (2 mM), 30 µl 10 x Reaktionspuffer $MgCl_2$ (20 mM), 217,2 µl $H_2O_{DEPC}$, 12 µl Taq-Polymerase (0,04 U/µl) und wurde je Reaktion mit 10 µl cDNA (0,04 µg cDNA/25 µl Ansatz) versetzt. Für die Amplifikation der in Kapitel 3.4.10.3 gewonnenen cDNA wurde eine dreiminütige initiale Denaturierung bei 95°C durchgeführt, gefolgt von einer genspezifischen Anzahl von Zyklen (Tab. 8). Die Zyklen setzten sich aus einer Denaturierungsphase bei 95°C für 45 sec, einer Annealingphase mit einer primerspezifischen Temperatur für 40 sec und einer Elongationsphase bei 70°C für 55 sec zusammen. Nach Ablauf des letzten Zyklus folgte eine finale Elongationsphase bei 72°C für 2,30 min und eine anschließende Kühlung auf 4°C.

#### 3.4.10.5 Darstellung der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden einer Gelelektrophorese unterzogen. Hierzu wurden 6 µl der Probe bzw. 4 µl des so genannten „Housekeeping-Gens“ (β-Actin; GAPDH, siehe 3.4.10.8) zu 2 µl Ladepuffer (1 ml Glycerin, 1 ml 1 x TAE, Bromphenolblau) gegeben und in ein Agarosegel (1,5%, 1 x TAE-Puffer) eingebracht, welches eine Ethidiumbromidkonzentration von 0,02% enthielt. Ein in dem Agarosegel ebenfalls mitlaufender DNA-Längenstandard (100 Bp bzw. 50 Bp DNA Ladder, MBI Fermentas) ermöglichte die Kontrolle der Fragmentgröße. Anschließend wurde in der Elektrophoresekammer eine Spannung von 80 V für 30 min angelegt.
Im Anschluss konnten die mit Ethidiumbromid markierten und im UV-Licht fluoreszierenden Banden mit Hilfe eines computergestützten Kamerasystems (SynGene, GeneFlash) digital dokumentiert werden.

#### 3.4.10.6 Messung der Optischen Dichte

Die Auswertung der digitalisierten Gele erfolgte durch Einlesen in ein Programm zur Erfassung von optischen Dichten (OD) (SynGene, GeneTools). Nach einer automatischen Hintergrundkorrektur wurden die Banden markiert und deren optische Dichte bestimmt.

#### 3.4.10.7 Optimierung der PCR-Protokolle

Unter optimierten Versuchsbedingungen durchläuft eine PCR drei Phasen:

Exponentielle Phase: Aufgrund ausreichender Reaktionskomponenten kommt es zu einer Verdoppelung des Templates mit jedem PCR-Zyklus.

Lineare Phase: Die Reaktionskomponenten werden verbraucht, welches zu einer Verlangsamung der Reaktion führt.

Plateau-Phase: Es entstehen keine weiteren Produkte, da die Reaktion durch eine Limitierung der Reaktionskomponenten zum Erliegen kommt.

Für die Auswertung einer semiquantitativen PCR ist es entscheidend, die Zyklenzahl zu ermitteln, in der die Reaktion die lineare Phase durchläuft, da bei Erreichen des Plateaus keine Aussage mehr über Genexpressionunterschiede getroffen werden kann.

Die Oligonukleotide, die in dieser Arbeit zum Nachweis verschiedener Gene eingesetzt wurden, durchliefen eine ansteigende Zahl von Zyklen, um die optimale Zyklenzahl zu ermitteln.
Die digitalisierten Gele wurden anschließend in einen Phosphorimager, der mit einem Programm zur Erfassung von OD (SynGene, GeneTools) ausgestattet war, eingelesen. Die so erfassten Intensitäten der spezifischen PCR-Produktbanden spiegelte deren Höhe wider. Die erhaltenen Werte wurden gegen die Zyklenzahl aufgetragen und diejenige Zyklenzahl eingesetzt, die sich innerhalb des linearen Anstiegs der PCR, d.h. vor Erreichen der Plateauphase befand.

#### 3.4.10.8 Normierung der Rohdaten

Als Standard wurde in jedem Gel ein Housekeeping-Gen mitgeführt. Ein Gen, welches als Standard eingesetzt werden soll, muss in allen Geweben exprimiert werden und darf durch die Versuchsbedingungen nicht beeinflusst werden. Bei einer erfolgreichen Amplifikation dient es als Kontrolle für die Präparation intakter RNA und das Funktionieren der PCR-Komponenten. In dieser Arbeit handelt es sich hierbei um Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bzw. β-Actin.
Um den Einfluss verschiedener Selenzulagen auf die Genexpression zu untersuchen, wurde der Signalquotient aus zu untersuchendem Gen (Bsp.: cGPx) und GAPDH (β-Actin) gebildet und auf den GAPDH-(β-Actin)-Standard normiert. Durch diese Normierung werden Unterschiede im PCR-Produkt korrigiert.

### 3.4.11 Statistische Methoden

*Parameter des Zellschutzes und der Zellschädigung einschließlich Selenoenzyme*

Die Berechnung der deskriptiven Parameter arithmetisches Mittel (M) und Standardabweichung (SD) erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL 7.0. Weitere statistische Auswertungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 12.0 durchgeführt.
Zunächst wurde anhand der Residuen die Normalverteilung mit dem Test nach KOLMOGOROV-SMIRNOV ($p \geq 0,05$) und nach SHAPIRO-WILK ($p \geq 0,01$) Test überprüft. Bei einer fehlenden Normalverteilung wurden die Daten nach logarithmischer Transformation oder Ziehen der Quadratwurzel ausgewertet.
Gruppenmittelwerte wurden mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (UNIANOVA) statistisch untersucht, wobei die Varianzhomogenität mittels LEVENE-Test ($p \geq 0,05$) überprüft wurde. Im Anschluss konnten die Mittelwerte der Gruppen mit zwei Signi-

fikanztests ausgewertet werden. Bei gegebener Varianzhomogenität wurde der TUKEY-Test angewandt, wenn Varianzheterogenität vorlag wurde der Signifikanztest nach GAMES-HOWELL ausgewählt.
In den Tabellen liegen Auswertungen aufgrund des Gruppenmittelwertes vor. Tiere, welche als Ausreißer ermittelt wurden und von der statistischen Auswertung ausgeschlossen wurden, sind den Anhangtabellen in *kursiver Schreibweise* zu entnehmen.
Wenn nicht anders gekennzeichnet, zeigen Hochbuchstaben signifikante Gruppenunterschiede im 5%-Fehlerintervall ($p < 0,05$).

*Parameter der differenziellen Genexpression*

Die Berechnung der deskriptiven Parameter des Microarray-Screenings erfolgte ebenfalls mit dem Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL 7.0. Des Weiteren wurde mit Hilfe des Programms EXCEL 7.0 die Normalverteilung der Daten überprüft und die statistische Auswertung der Microarraydaten anhand des Students t-Signifikanztests ($p < 0,05$) durchgeführt.

# 4 Ergebnisse

## 4.1 Energie-, Mineral- und Rohnährstoffgehalt in den Versuchsdiäten

Die analysierten Rohnährstoffgehalte der Weender Analyse (TM, XP, XF, XA), der Bruttoenergiegehalt und der Gehalt ausgewählter Mengen- und Spurenelemente (Ca, P, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn) in den Diäten zeigten im Rahmen des Analysenspielraums eine gute Übereinstimmung sowohl innerhalb der sieben Versuchsdiäten (Gruppe 0-VI) als auch zwischen den zwei Versuchsdurchläufen (Tab. 9). Die analysierten Gehalte erfüllten (mit Ausnahme des Se-Gehaltes in der Basisdiät) die Mindestanforderungen an eine Diät für wachsende Ratten laut Empfehlungen des NRC (U.S.A).

***Tabelle 9:*** *Energie-, Mineral- und Rohnährstoffgehalt der Versuchsdiäten 1 und 2*

| Diäten Versuch 1 | | | Diäten Versuch 2 | | |
|---|---|---|---|---|---|
| TM-Gehalt (%) | M<br>SD | 91,89<br>1,17 | TM-Gehalt (%) | M<br>SD | 90,83<br>0,63 |
| Bruttoenergie (MJ/kg Diät) | M<br>SD | 18,07<br>0,16 | Bruttoenergie (MJ/kg Diät) | M<br>SD | 18,01<br>0,15 |
| Rohprotein (XP) (% d. FM) | M<br>SD | 15,30<br>0,55 | Rohprotein (XP) (% d. FM) | M<br>SD | 15,00<br>0,28 |
| Rohfett (XL) (% d. FM) | M<br>SD | 6,32<br>0,40 | Rohfett (XL) (% d. FM) | M<br>SD | 7,05<br>0,18 |
| Rohfaser (XF) (% d. FM) | M<br>SD | 5,00<br>0,32 | Rohfaser (XF) (% d. FM) | M<br>SD | 5,05<br>0,34 |
| Rohasche (XA) (% d. FM) | M<br>SD | 3,35<br>0,30 | Rohasche (XA) (% d. FM) | M<br>SD | 3,16<br>0,03 |
| Calcium (g/kg FM) | M<br>SD | 5,01<br>0,14 | Calcium (g/kg FM) | M<br>SD | 5,11<br>0,08 |
| Phosphor (g/kg FM) | M<br>SD | 4,40<br>0,17 | Phosphor (g/kg FM) | M<br>SD | 4,26<br>0,08 |
| Magnesium (mg/kg FM) | M<br>SD | 688,0<br>17,29 | Magnesium (mg/kg FM) | M<br>SD | 671,5<br>0,01 |
| Eisen (mg/kg FM) | M<br>SD | 59,85<br>5,19 | Eisen (mg/kg FM) | M<br>SD | 58,55<br>2,23 |
| Kupfer (mg/kg FM) | M<br>SD | 8,65<br>1,13 | Kupfer (mg/kg FM) | M<br>SD | 8,68<br>0,68 |
| Zink (mg/kg FM) | M<br>SD | 65,82<br>3,81 | Zink (mg/kg FM) | M<br>SD | 65,59<br>3,66 |
| Mangan (mg/kg FM) | M<br>SD | 20,04<br>3,13 | Mangan (mg/kg FM) | M<br>SD | 19,24<br>1,63 |

## 4.2 Selengehalt in den Versuchsdiäten

Die Voraussetzungen für die Durchführung dieser Versuche war in erster Linie abhängig von der Konzeption einer selenarmen Basisdiät mit einem Selengehalt unterhalb der Nachweisgrenze von < 0,03 mg Se/kg Diät. Des Weiteren mussten die selenhaltigen Versuchsdiäten eine homogene Verteilung der verschiedenen anorganischen Selenverbindungen und den angestrebten Selengehalt aufweisen.

Die Bestimmung des Selengehaltes in den Diäten (Tab. 10) ergab in den Versuchsgruppen 0, welche die Basisdiät erhielten, einen Gehalt von < 0,03 mg Se/kg Diät. Dieser Gehalt lag unterhalb der Nachweisgrenze und genügte dem Anspruch an eine Selenmangeldiät. Die selensupplementierten Versuchsgruppen (I-VI) wiesen eine homogene Verteilung der anorganischen Selenverbindungen (Natriumselenit oder Natriumselenat) in den Versuchsdiäten auf und erfüllten die Ansprüche an eine ausreichende Wiederfindung der Selenzulagen in Höhe von 0,2; 1,0 und 2,0 mg Se/kg Diät.

***Tabelle 10:*** *Selengehalt der Versuchsdiäten 1 und 2*

| Versuch 1 | | | Versuch 2 | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | | Selen (mg/kg) | Gruppe | | Selen (mg/kg) |
| 0 | M<br>SD | * | 0 | M<br>SD | * |
| I | M<br>SD | 0,214<br>0,009 | I | M<br>SD | 0,184<br>0,015 |
| II | M<br>SD | 0,190<br>0,010 | II | M<br>SD | 0,230<br>0,004 |
| III | M<br>SD | 0,961<br>0,071 | III | M<br>SD | 0,960<br>0,024 |
| IV | M<br>SD | 0,834<br>0,025 | IV | M<br>SD | 0,961<br>0,020 |
| V | M<br>SD | 1,65<br>0,024 | V | M<br>SD | 1,93<br>0,064 |
| VI | M<br>SD | 1,71<br>0,070 | VI | M<br>SD | 1,91<br>0,077 |

* unterhalb der Nachweisgrenze von 0,03 mg Se/kg Diät

## 4.3 Futteraufnahme, Lebendmasseentwicklung und Futterverwertung

Die Tabellen 11 und 12 zeigen Futteraufnahme, Futterverwertung, Lebendmasseentwicklung und tägliche Zunahmen der Versuchsgruppen im Verlauf des 8-wöchigen Fütterungsversuches.

***Tabelle 11:*** *Wöchentliche Futteraufnahme, Gesamtfutteraufnahme und Futterverwertung der Ratten in Versuch 1 und 2*

| Versuch 1 | | Wöchentliche Futteraufnahme (g) | | | | | | | | $FA_G$ (g) | FV (g/g) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | | $d_{1-7}$ | $d_{8-14}$ | $d_{15-21}$ | $d_{22-28}$ | $d_{29-35}$ | $d_{36-42}$ | $d_{43-49}$ | $d_{50-56}$ | $d_{1-56}$ | |
| 0 | M | 108,7$^{a}$ | 138,8$^{a}$ | 151,0 | 152,7$^{ab}$ | 157,8 | 198,2 | 108,0 | 148,4$^{a}$ | 1165 | 5,10 |
| | SD | 9,54 | 9,47 | 16,96 | 14,25 | 11,99 | 21,73 | 14,45 | 13,15 | 97,25 | |
| I | M | 112,9$^{a}$ | 140,9$^{a}$ | 153,2 | 151,2$^{a}$ | 165,2 | 206,3 | 132,4 | 131,5$^{ab}$ | 1186 | 5,04 |
| | SD | 13,76 | 7,66 | 16,77 | 17,78 | 13,86 | 11,94 | 8,63 | 12,52 | 80,38 | |
| II | M | 99,69$^{ab}$ | 125,1$^{ab}$ | 146,9 | 150,9$^{ab}$ | 151,3 | 195,5 | 128,6 | 127,1$^{b}$ | 1107 | 5,08 |
| | SD | 10,87 | 9,20 | 11,84 | 13,15 | 14,36 | 18,13 | 8,12 | 6,56 | 76,99 | |
| III | M | 94,34$^{b}$ | 120,5$^{b}$ | 139,7 | 153,2$^{b}$ | 151,6 | 193,2 | 104,0 | 125,0$^{b}$ | 1078 | 4,89 |
| | SD | 6,07 | 11,62 | 14,26 | 11,56 | 9,42 | 17,47 | 14,53 | 10,32 | 75,27 | |
| IV | M | 100,5$^{ab}$ | 121,3$^{b}$ | 142,2 | 157,6$^{b}$ | 152,3 | 188,1 | 106,9 | 131,2$^{bc}$ | 1085 | 5,00 |
| | SD | 3,93 | 5,64 | 4,90 | 6,23 | 7,72 | 10,18 | 7,42 | 14,39 | 26,50 | |
| V | M | 105,8$^{ab}$ | 122,2$^{b}$ | 147,5 | 157,9$^{ab}$ | 161,1 | 203,1 | 114,8 | 149,0$^{ac}$ | 1161 | 5,07 |
| | SD | 9,49 | 14,71 | 18,37 | 15,48 | 17,13 | 17,45 | 20,54 | 11,27 | 87,34 | |
| VI | M | 107,0$^{ab}$ | 122,8$^{b}$ | 149,8 | 170,9$^{ab}$ | 157,0 | 201,6 | 111,3 | 139,1$^{ab}$ | 1147 | 4,91 |
| | SD | 10,47 | 14,03 | 20,11 | 18,45 | 18,39 | 19,55 | 12,94 | 17,24 | 90,17 | |
| **Versuch 2** | | **Wöchentliche Futteraufnahme (g)** | | | | | | | | **$FA_G$ (g)** | **FV (g/g)** |
| Gruppe | | $d_{1-7}$ | $d_{8-14}$ | $d_{15-21}$ | $d_{22-28}$ | $d_{29-35}$ | $d_{36-42}$ | $d_{43-49}$ | $d_{50-56}$ | $d_{1-56}$ | |
| 0 | M | 82,25$^{abc}$ | 95,26$^{abc}$ | 120,8$^{a}$ | 130,3$^{a}$ | 135,8$^{a}$ | 140,2 | 140,0$^{ac}$ | 126,8 | 971,7$^{a}$ | 3,88 |
| | SD | 9,71 | 32,90 | 10,16 | 8,57 | 7,00 | 8,87 | 5,67 | 11,46 | 71,81 | |
| I | M | 93,71$^{a}$ | 118,2$^{ab}$ | 131,3$^{ab}$ | 142,8$^{ab}$ | 148,8$^{ab}$ | 152,5 | 150,1$^{ab}$ | 143,3 | 1080$^{bc}$ | 3,71 |
| | SD | 3,57 | 5,69 | 11,09 | 9,03 | 9,12 | 9,50 | 9,71 | 21,0 | 61,75 | |
| II | M | 84,00$^{abc}$ | 123,5$^{a}$ | 136,0$^{b}$ | 148,1$^{b}$ | 155,5$^{b}$ | 153,4 | 160,0$^{b}$ | 145,7 | 1106$^{b}$ | 3,73 |
| | SD | 6,44 | 8,44 | 6,45 | 11,05 | 15,26 | 10,52 | 13,96 | 18,78 | 77,51 | |
| III | M | 88,23$^{abc}$ | 114,1$^{ab}$ | 123,6$^{ab}$ | 132,9$^{a}$ | 145,0$^{ab}$ | 141,3 | 146,5$^{ab}$ | 132,4 | 1024$^{ab}$ | 3,71 |
| | SD | 4,30 | 5,66 | 5,94 | 8,19 | 7,19 | 9,14 | 5,25 | 7,86 | 26,51 | |
| IV | M | 90,02$^{ab}$ | 115,1$^{ab}$ | 126,2$^{ab}$ | 138,4$^{ab}$ | 145,0$^{ab}$ | 142,3 | 132,4$^{a}$ | 142,4 | 1032$^{ab}$ | 3,81 |
| | SD | 7,42 | 9,99 | 10,32 | 8,75 | 10,14 | 7,64 | 8,05 | 18,59 | 54,21 | |
| V | M | 80,17$^{bc}$ | 110,4$^{bc}$ | 124,8$^{ab}$ | 137,7$^{ab}$ | 146,7$^{ab}$ | 144,2 | 147,2$^{c}$ | 131,7 | 1023$^{ab}$ | 3,84 |
| | SD | 9,15 | 5,47 | 7,17 | 7,97 | 8,17 | 9,52 | 9,01 | 12,28 | 35,09 | |
| VI | M | 77,16$^{c}$ | 101,5$^{c}$ | 124,7$^{ab}$ | 135,6$^{ab}$ | 139,7$^{a}$ | 140,4 | 147,7$^{c}$ | 131,3 | 997,9$^{ac}$ | 3,79 |
| | SD | 10,59 | 5,36 | 6,19 | 7,81 | 7,41 | 12,91 | 7,61 | 9,98 | 41,54 | |

Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte (Versuch 1: wöchentl. FA , $FA_G$, FV, Tukey-HSD; Versuch 2: wöchentl. FA $d_{1-49}$ , $FA_G$, Tukey-HSD; FA $d_{50-56}$, FV, Games-Howell, $p < 0,05$)

***Tabelle 12:*** *Lebendmasseentwicklung, Gesamtlebendmassezunahme und tägliche Zunahmen der Ratten in Versuch 1 und 2*

| Versuch 1 | | Lebendmasseentwicklung (g) | | | | | | | | $LMZ_G$ (g) | TZ (g/d) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | | $d_{1-7}$ | $d_{8-14}$ | $d_{15-21}$ | $d_{22-28}$ | $d_{29-35}$ | $d_{36-42}$ | $d_{43-49}$ | $d_{50-56}$ | $d_{1-56}$ | |
| 0 | M | 101,6 | 144,4$^{a}$ | 184,3 | 215,7$^{ab}$ | 241,5$^{ab}$ | 267,4 | 274,6 | 291,1 | 228,8 | 4,08 |
| | SD | 5,95 | 5,36 | 8,77 | 10,59 | 12,45 | 20,28 | 23,06 | 30,06 | | |
| I | M | 100,2 | 144,9$^{ab}$ | 176,7 | 221,2$^{a}$ | 249,9$^{a}$ | 274,6 | 284,2 | 298,4 | 235,5 | 4,21 |
| | SD | 7,08 | 7,82 | 18,71 | 10,40 | 8,99 | 17,37 | 16,71 | 16,77 | | |
| II | M | 93,88 | 133,4$^{ab}$ | 172,4 | 207,5$^{ab}$ | 227,5$^{ab}$ | 254,2 | 263,9 | 274,9 | 212,1 | 3,79 |
| | SD | 5,87 | 7,43 | 7,63 | 8,03 | 16,30 | 18,63 | 19,87 | 20,77 | | |
| III | M | 92,89 | 129,6$^{b}$ | 168,4 | 202,0$^{ab}$ | 229,7$^{ab}$ | 256,9 | 266,7 | 283,4 | 220,7 | 3,94 |
| | SD | 7,39 | 12,40 | 15,74 | 18,02 | 19,52 | 23,26 | 26,00 | 29,29 | | |
| IV | M | 95,70 | 133,2$^{ab}$ | 171,8 | 202,4$^{b}$ | 229,9$^{b}$ | 255,9 | 265,9 | 279,8 | 217,0 | 3,87 |
| | SD | 7,32 | 10,34 | 11,56 | 9,78 | 10,42 | 9,29 | 10,62 | 15,56 | | |
| V | M | 98,56 | 133,1$^{ab}$ | 172,7 | 215,2$^{ab}$ | 242,6$^{ab}$ | 264,3 | 277,6 | 291,7 | 229,0 | 4,09 |
| | SD | 5,52 | 9,36 | 14,57 | 8,95 | 7,97 | 19,26 | 18,51 | 20,29 | | |
| VI | M | 97,54 | 131,7$^{ab}$ | 171,6 | 210,4$^{ab}$ | 231,6$^{ab}$ | 259,8 | 266,4 | 296,5 | 233,8 | 4,18 |
| | SD | 6,78 | 11,62 | 19,16 | 22,32 | 28,61 | 28,33 | 23,17 | 27,74 | | |
| Versuch 2 | | Lebendmasseentwicklung (g) | | | | | | | | $LMZ_G$ (g) | TZ (g/d) |
| Gruppe | | $d_{1-7}$ | $d_{8-14}$ | $d_{15-21}$ | $d_{22-28}$ | $d_{29-35}$ | $d_{36-42}$ | $d_{43-49}$ | $d_{50-56}$ | $d_{1-56}$ | |
| 0 | M | 99,90$^{a}$ | 137,9$^{ac}$ | 178,2$^{a}$ | 216,0$^{a}$ | 249,7$^{a}$ | 276,0$^{a}$ | 295,2$^{a}$ | 311,6$^{a}$ | 251,2$^{a}$ | 4,48$^{a}$ |
| | SD | 5,92 | 8,58 | 7,10 | 8,56 | 9,53 | 12,40 | 13,94 | 15,43 | | |
| I | M | 112,6$^{b}$ | 160,6$^{b}$ | 204,7$^{b}$ | 246,7$^{b}$ | 282,2$^{b}$ | 310,4$^{b}$ | 330,6$^{b}$ | 352,3$^{bc}$ | 291,7$^{bc}$ | 5,21$^{bc}$ |
| | SD | 5,57 | 9,62 | 14,86 | 13,52 | 14,44 | 16,83 | 18,00 | 19,35 | | |
| II | M | 104,4$^{ab}$ | 156,2$^{b}$ | 202,8$^{b}$ | 246,1$^{b}$ | 284,5$^{b}$ | 311,9$^{b}$ | 334,6$^{b}$ | 357,0$^{c}$ | 296,5$^{b}$ | 5,29$^{b}$ |
| | SD | 7,48 | 10,10 | 9,52 | 12,03 | 16,72 | 16,84 | 18,16 | 20,39 | | |
| III | M | 106,7$^{ab}$ | 150,0$^{ab}$ | 190,4$^{ab}$ | 230,0$^{ab}$ | 268,9$^{ab}$ | 296,5$^{ab}$ | 314,8$^{ab}$ | 336,6$^{ab}$ | 276,2$^{ab}$ | 4,93$^{ab}$ |
| | SD | 3,63 | 6,57 | 10,87 | 11,72 | 11,36 | 9,70 | 8,14 | 9,10 | | |
| IV | M | 106,4$^{ab}$ | 149,7$^{abc}$ | 195,8$^{ab}$ | 230,6$^{ab}$ | 265,5$^{ab}$ | 293,0$^{ab}$ | 303,0$^{a}$ | 330,9$^{ab}$ | 270,5$^{ab}$ | 4,83$^{ab}$ |
| | SD | 5,43 | 10,93 | 3,88 | 14,82 | 15,25 | 12,76 | 8,76 | 12,18 | | |
| V | M | 99,24$^{a}$ | 141,4$^{ac}$ | 185,4$^{a}$ | 225,3$^{a}$ | 262,2$^{ab}$ | 288,8$^{ab}$ | 301,5$^{a}$ | 327,5$^{ac}$ | 267,0$^{ac}$ | 4,77$^{ac}$ |
| | SD | 6,80 | 8,07 | 9,78 | 10,02 | 9,32 | 11,06 | 10,10 | 15,87 | | |
| VI | M | 97,13$^{a}$ | 134,3$^{c}$ | 178,7$^{a}$ | 218,9$^{a}$ | 253,4$^{a}$ | 281,5$^{a}$ | 302,2$^{a}$ | 323,9$^{a}$ | 263,6$^{a}$ | 4,71$^{a}$ |
| | SD | 8,66 | 5,30 | 5,67 | 7,36 | 8,70 | 11,25 | 14,37 | 14,05 | | |

Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte (Versuch 1: wöchent. LM, $LMZ_G$, TZ, Tukey-HSD; Versuch 2: wöchentl. LM $d_{1-21}$, $LMd_{36-56}$, $LMZ_G$, TZ, Tukey-HSD; LM $d_{22-35}$, Games-Howell, $p < 0,05$)

In den zwei Versuchsdurchläufen konnten für die Futterverwertung (FV) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ermittelt werden, allerdings war die durchschnittliche FV in Versuch 2 mit 3,78 g Futteraufwand je g Lebendmassezunahme im Vergleich zu Versuch 1 mit durchschnittlich 4,31 g/g günstiger.

Die Gesamtfutteraufnahme ($FA_G$) in Versuch 1 wies ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf. In Versuch 2 hatten die adäquat versorgten Gruppen I und II allerdings eine höhere $FA_G$. Ein statistisch signifikanter

Unterschied konnte hier aber lediglich zwischen Gruppe II und den Gruppen 0 und VI nachgewiesen werden. In Versuch 1 konnte im Versuchsverlauf kein signifikanter Einfluss der Selenversorgung auf Lebendmasseentwicklung, Gesamtlebendmassezunahme ($LMZ_G$) oder tägliche Zunahmen (TZ) beobachtet werden.
Hingegen war in Versuch 2 die Lebendmasseentwicklung der Tiere aus den Gruppen I und II bereits ab Versuchswoche 2 ($d_{8-14}$) signifikant höher als die der Gruppe 0, welche die Selenmangeldiät erhielt. Dieser Verlauf ist bis zu der Versuchswoche 8 ($d_{50-56}$) beobachtbar und erstreckt sich zeitweilig ebenfalls auf Versuchsgruppen mit einer supranutritiven Selenversorgungsstufe. Dieser Verlauf spiegelt sich ebenfalls in der $LMZ_G$ und den TZ wider. Hier erreichen die adäquat versorgten Versuchsgruppen signifikant höhere Zunahmen als die Selenmangelgruppe.

## 4.4 Selengehalt und Selenoenzymaktivität in Blutplasma und Leber

In Tabelle 13 sind verschiedene Selenstatusparameter zusammengestellt. Die Plasma- und Leberselengehalte fallen im Selenmangel signifikant ab und steigen mit zunehmender Selenzulage in den Gruppen I-VI deutlich an. Hierbei ist ein nahezu linearer Anstieg der Selengehalte in der Leber zu beobachten, während die Selenkonzentration im Plasma bereits eine Sättigungskurve beschreibt.
Ein im Selenmangel signifikanter Abfall der Aktivität ist ebenfalls bei den untersuchten Selenoenzymen zu beobachten. So fällt die Aktivität der Glutathionperoxidasen: cGPx, PHGPx und pGPx um durchschnittlich 99%, 51% und 98% im Vergleich zu den selenversorgten Gruppen ab. Auch die Thioredoxinreduktasen TrxR1 und TrxR2 erreichen im Selenmangel nur 26% bzw. 20% der Aktivität in den Gruppen I-VI. Bei der pGPx, PHGPx, TrxR1 und TrxR2 konnte in den Selenzulagegruppen I-VI kein gerichteter Einfluss durch die beiden anorganischen Selenverbindungen und die drei Selenzulagestufen von 0,2; 1,0 und 2,0 mg Se/kg Diät beobachtet werden. Einzig die Aktivität der cGPx in Gruppe V (2,0 mg Se/kg Diät in Form von Natriumselenit) weist wiederholt einen signifikanten Abfall der Enzymaktivität im Vergleich zu den anderen selenversorgten Gruppen auf.

***Tabelle 13:*** *Selengehalte und Selenoenzymaktivitäten in Leber und Plasma wachsender Ratten nach 8-wöchiger Versuchsdauer (Versuch 1 und 2)*

| Versuch 1 | | Blutplasma | | Leber | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | | Se (µg/kg) | pGPx (mU/mg Prot.) | Se (µg/kg) | cGPx (mU/mg Prot.) | TrxR1 (mU/mg Prot.) | TrxR2 (Q:TrxR2/SDH) |
| 0 | M | 28,27$^{a}$ | 2,66$^{a}$ | 21,22$^{a}$ | 8,24$^{a}$ | 1,72$^{a}$ | 0,54$^{a}$ |
| | SD | 3,60 | 0,48 | 2,40 | 2,87 | 0,38 | 0,33 |
| I | M | 552,5$^{b}$ | 81,24$^{bc}$ | 1044$^{b}$ | 662,6$^{be}$ | 6,06$^{b}$ | 2,04$^{b}$ |
| | SD | 30,70 | 12,42 | 88,6 | 85,65 | 0,55 | 0,72 |
| II | M | 545,1$^{b}$ | 71,41$^{bc}$ | 1050$^{b}$ | 654,4$^{be}$ | 6,26$^{bc}$ | 2,90$^{b}$ |
| | SD | 49,70 | 12,55 | 78,4 | 97,57 | 1,00 | 0,87 |
| III | M | 658,6$^{cd}$ | 68,79$^{bc}$ | 2233$^{c}$ | 562,7$^{bc}$ | 6,83$^{bc}$ | 2,43$^{b}$ |
| | SD | 50,60 | 8,60 | 197,0 | 45,71 | 0,48 | 0,71 |
| IV | M | 627,2$^{bc}$ | 77,35$^{b}$ | 2184$^{c}$ | 522,5$^{c}$ | 6,56$^{bc}$ | 2,00$^{b}$ |
| | SD | 59,90 | 5,99 | 148,7 | 93,79 | 0,42 | 0,58 |
| V | M | 741,8$^{d}$ | 73,03$^{bc}$ | 2895$^{d}$ | 376,8$^{d}$ | 7,26$^{c}$ | 2,70$^{b}$ |
| | SD | 68,0 | 15,36 | 302,9 | 88,54 | 0,70 | 1,10 |
| VI | M | 675,5$^{cd}$ | 57,72$^{c}$ | 2965$^{d}$ | 746,2$^{e}$ | 6,35$^{bc}$ | 2,81$^{b}$ |
| | SD | 73,70 | 12,46 | 177,8 | 98,58 | 1,05 | 1,01 |

| Versuch 2 | | Blutplasma | | Leber | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | | Se (µg/kg) | pGPx (mU/mg Prot.) | Se (µg/kg) | cGPx (mU/mg Prot.) | PHGPx (mU/mg Prot.) |
| 0 | M | 22,94$^{a}$ | 1,80$^{a}$ | 18,45$^{a}$ | 4,98$^{a}$ | 0,20$^{a}$ |
| | SD | 3,10 | 0,85 | 2,01 | 3,10 | 0,03 |
| I | M | 543,7$^{b}$ | 119,0 $^{b}$ | 1054$^{b}$ | 425,3$^{b}$ | 0,42$^{b}$ |
| | SD | 20,1 | 10,87 | 73,30 | 46,53 | 0,08 |
| II | M | 571,0$^{b}$ | 148,8 $^{bc}$ | 1343$^{c}$ | 454,4$^{b}$ | 0,37$^{b}$ |
| | SD | 31,8 | 22,64 | 104,9 | 91,78 | 0,07 |
| III | M | 648,4$^{c}$ | 160,8 $^{c}$ | 2469$^{d}$ | 455,2$^{b}$ | 0,43$^{b}$ |
| | SD | 21,4 | 24,83 | 122,8 | 43,76 | 0,10 |
| IV | M | 609,9$^{bc}$ | 132,8 $^{bc}$ | 2292$^{d}$ | 390,7$^{b}$ | 0,35$^{b}$ |
| | SD | 44,4 | 14,08 | 130,7 | 40,57 | 0,04 |
| V | M | 706,4$^{d}$ | 136,6 $^{bc}$ | 3010$^{e}$ | 306,1$^{c}$ | 0,39$^{b}$ |
| | SD | 30,8 | 15,92 | 113,1 | 43,12 | 0,09 |
| VI | M | 706,3$^{d}$ | 140,7 $^{bc}$ | 3060$^{e}$ | 452,3$^{b}$ | 0,48$^{b}$ |
| | SD | 37,8 | 18,03 | 180,4 | 67,19 | 0,11 |

Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte (Versuch 1: Se-Plasma, PHGPx, Tukey-HSD; pGPx, cGPx, Se-Leber, Games-Howell; Versuch 2: Se-Leber, TrxR1, TrxR2, cGPx, Tukey-HSD; Se-Plasma, Games-Howell; pGPx, Kruskal, Median, T-Test; Se-Leber, LN-Transformation, $p < 0,05$)

## 4.5 Zellschutzparameter in der Leber (Glutathionmetabolismus)

In Tabelle 14 sind verschiedene Parameter des Glutathionmetabolismus dargestellt. Durch die Bestimmung der Gehalte an Gesamtglutathion (Total GSH, TGSH), oxidierten Glutathion (GSSG) und dem Verhältnis von GSSG/TGSH im Leberhomogenat konnte in beiden Versuchsdurchläufen eine signifikante Abnahme des Gehaltes an GSSG in den Selenmangelgruppen nachgewiesen werden. Der TGSH-Gehalt hingegen war im Vergleich zu den selenversorgten Gruppen zwar tendenziell erniedrigt, konnte aber lediglich für einzelne Versuchsgruppen statistisch abgesichert werden. Neben den geringeren GSSG-Gehalten im Selenmangel ist auch das Verhältnis von GSSG/TGSH in beiden Versuchen signifikant auf die Seite des reduzierten Glutathions (GSH) verschoben. Denn im Selenmangel fällt der GSSG-Anteil am Gesamtglutathion auf ca. 13% bzw. 6% (Versuch 1/ Versuch 2) gegenüber durchschnittlich 25 % bzw. 34% (Versuch 1/ Versuch 2) in den selenversorgten Gruppen. Ein gerichteter Einfluss verschiedener Selenzulagen und Selenverbindungen konnte bei der Bestimmung von GSSG und dem Verhältnis von GSSG/TGSH nicht beobachtet werden.

Während in Versuch 2 kein gerichteter Einfluss der sieben Diäten auf die Aktivität der Glutathionreduktase (GR) erkennbar ist, stieg in Versuch 1 die Aktivität der GR in der Selenmangelgruppe um 34% im Vergleich zu den selenversorgten Gruppen I-VI.

Bei der Bestimmung der Glutathion-S-Transferase Aktivität (GST) mit einem unspezifischen Substrat, welches GSTs erfasst, die keine Peroxidaseaktivität aufweisen, konnte kein Einfluss verschiedener Selenzulagen oder Selenverbindungen auf die Enzymaktivität der GSTs nachgewiesen werden. In Versuch 2 wurde zusätzlich mit einem spezifischen Substrat eine gezielte Bestimmung der GSTs durchgeführt, welche eine Peroxidaseaktivität besitzen. Die so genannten $\alpha$ Klasse GST ($\alpha$GST) reagierten mit einem signifikanten Abfall der Aktivität in den adäquat versorgten Gruppen I und II gegenüber der Gruppe 0. Des Weiteren ist ein tendenzieller Anstieg der Aktivität in den supranutritiv versorgten Gruppen III-VI im Vergleich zu den Gruppen I und II erkennbar.

***Tabelle 14:*** *Zellschutzparameter in der Leber wachsender Ratten nach 8-wöchiger Versuchsdauer (Versuch 1 und 2)*

| Versuch 1 | | Leber | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | | Total GSH (μg/mg Prot.) | GSSG (μg/mg Prot.) | GSSG/ TGSH | GR (mU/mg Prot.) | GST (U/mg Prot.) |
| 0 | M | 4,78[a] | 0,61[a] | 0,11[a] | 73,20[a] | 0,83[ac] |
| | SD | 1,24 | 0,32 | 0,05 | 16,91 | 0,17 |
| I | M | 5,43[ab] | 1,30[b] | 0,24[b] | 45,96[b] | 0,62[a] |
| | SD | 1,47 | 0,37 | 0,05 | 8,64 | 0,15 |
| II | M | 7,79[bc] | 1,94[bc] | 0,23[b] | 30,05[c] | 0,89[ab] |
| | SD | 1,45 | 0,73 | 0,04 | 12,21 | 0,28 |
| III | M | 7,03[bc] | 1,91[bc] | 0,27[b] | 57,88[b] | 1,32[b] |
| | SD | 1,50 | 0,61 | 0,05 | 10,05 | 0,35 |
| IV | M | 6,91[ac] | 1,60[bc] | 0,23[b] | 53,69[b] | 1,04[bc] |
| | SD | 1,89 | 0,22 | 0,07 | 8,64 | 0,24 |
| V | M | 9,24[c] | 2,12[c] | 0,24[b] | 52,24[b] | 1,11[b] |
| | SD | 1,97 | 0,55 | 0,05 | 9,62 | 0,14 |
| VI | M | 7,89[c] | 1,96[bc] | 0,26[b] | 52,36[b] | 0,88[ab] |
| | SD | 1,11 | 0,22 | 0,03 | 5,90 | 0,25 |

| Versuch 2 | | Leber | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | | Total GSH (μg/mg Prot.) | GSSG (μg/mg Prot.) | GSSG/ TGSH | GR (mU/mg Prot.) | GST (U/mg Prot.) | αGST (mU/mg Prot.) |
| 0 | M | 8,46[a] | 0,52[a] | 0,06[a] | 35,02[ab] | 1,00[abc] | 166,1[a] |
| | SD | 1,24 | 0,08 | 0,01 | 4,51 | 0,10 | 24,20 |
| I | M | 10,45[ac] | 4,09[bc] | 0,39[c] | 30,04[a] | 0,94[ac] | 120,9[b] |
| | SD | 1,55 | 0,50 | 0,03 | 2,80 | 0,11 | 14,87 |
| II | M | 12,16[bcd] | 3,57[bc] | 0,32[bc] | 34,69[bc] | 1,04[abc] | 128,9[bc] |
| | SD | 1,50 | 0,97 | 0,07 | 1,56 | 0,15 | 18,99 |
| III | M | 12,74[bcd] | 4,29[bc] | 0,34[bc] | 36,14[b] | 0,99[abc] | 146,0[ab] |
| | SD | 1,75 | 0,66 | 0,04 | 1,33 | 0,09 | 6,20 |
| IV | M | 11,44[ad] | 3,83[b] | 0,36[bc] | 32,67[ab] | 0,85[c] | 142,5[ab] |
| | SD | 1,37 | 0,62 | 0,04 | 2,56 | 0,10 | 17,33 |
| V | M | 13,67[bd] | 4,71[bc] | 0,34[b] | 32,03[ac] | 1,17[b] | 155,9[ac] |
| | SD | 1,60 | 0,71 | 0,02 | 2,26 | 0,18 | 15,16 |
| VI | M | 14,51[b] | 5,04[c] | 0,35[bc] | 35,73[ab] | 1,09[ab] | 149,0[ab] |
| | SD | 2,44 | 0,47 | 0,04 | 3,34 | 0,17 | 19,13 |

Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte (Versuch 1: GSSG/GSH, Tot. GSH, GR, Tukey-HSD; GST, GSSG, Games-Howell; Versuch 2: αGST, GST, Tot. GSH Tukey-HSD; GR, GSSG, GSSG/GSH Games-Howell; $p < 0,05$)

## 4.6 Zellschädigungsparameter in der Leber (Lipide, Proteine)

Der Gehalt an Proteincarbonylen (PC) sowie die Aktivität der γ-Glutaminsynthetase (γGS) als Parameter der Proteinschädigung wurden durch die Fütterung verschiedener Versuchsdiäten nicht signifikant beeinflusst (Tab. 15). Lediglich die Aktivität der γGS in Gruppe V ist signifikant niedriger als in den übrigen Versuchsgruppen.

Die thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBA-RS) hingegen reagierten deutlich auf die Fütterung verschiedener Selenzulagen und Selenverbindungen. Hierbei hat die Selenmangelgruppe die höchsten TBA-RS-Gehalte, welche mit steigendem Selengehalt im Versuchsfutter signifikant abnehmen. Bei einer Selenversorgung in Höhe der Empfehlung (0,2 mg Se/kg Diät) und bei der ersten supranutritiven Dosierung (1,0 mg Se/kg Diät) zeigte Natriumselenat jeweils eine signifikant höhere Wirksamkeit in der Verminderung der TBA-RS als Natriumselenit.

***Tabelle 15:*** *Zellschädigungsparameter in der Leber wachsender Ratten nach 8-wöchiger Versuchsdauer (Versuch 1)*

| Versuch 1 | | Leber | | |
|---|---|---|---|---|
| Gruppe | | TBA-RS (nmol/g FM) | PC (nmol/mg Prot.) | γGS (U/mg Prot.) |
| 0 | M | 115,9[a] | 1,52 | 7,00[a] |
| | SD | 6,78 | 0,56 | 3,30 |
| I | M | 89,26[b] | 1,54 | 8,55[a] |
| | SD | 9,35 | 0,91 | 4,53 |
| II | M | 63,67[c] | 1,54 | 8,00[a] |
| | SD | 9,18 | 0,67 | 3,42 |
| III | M | 49,40[d] | 1,68 | 9,55[a] |
| | SD | 4,81 | 0,64 | 3,19 |
| IV | M | 37,94[e] | 1,01 | 9,97[a] |
| | SD | 6,51 | 0,30 | 6,86 |
| V | M | 22,25[f] | 1,13 | 5,51[b] |
| | SD | 4,17 | 0,39 | 2,12 |
| VI | M | 27,09[f] | 1,43 | 8,91[a] |
| | SD | 4,33 | 0,37 | 2,64 |

Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte (Versuch 1: γGS, Tukey-HSD; PC, TBA-RS, Games-Howell; γGS, LN-Transformation, $p < 0,05$)

## 4.7 Differenzielle Genexpression in der Leber

### 4.7.1 Selenoenzyme und Zellschutzparameter

In Versuch 1 wurde die Untersuchung der Expressionsunterschiede ausgewählter Selenoenzyme und Zellschutzparameter für die Gruppen 0-IV mit Hilfe der Microarraytechnologie durchgeführt. Die Daten aus dem Microarray-Screening wurden mittels RT-PCR verifiziert und zusätzlich die Expression in den Gruppen V und VI ermittelt. In Versuch 2 wurde der Einfluss verschiedener Selenzulagen und Selenverbindungen auf die Expression ausgewählter Gene einzig mittels RT-PCR untersucht.

Die Regulation der Glutathionperoxidasen wurde in beiden Versuchen unterschiedlich durch die Selenzulage beeinflusst. So konnte bei der Expression der cGPx ein Anstieg in den selenversorgten Gruppen I-VI beobachtet werden (Tab. 16).

***Tabelle 16:*** *Genexpression der cGPx ermittelt durch Microarray-Screening und RT-PCR in Versuch 1 und 2*

| Gen | Auswertung | x-fache Veränderung gegenüber Kontrolle Se 0 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Name | Gruppe | I | II | III | IV | V | VI |
| cGPx (NM 0308261) | Microarray | ↑7,0 | ↑6,6 | ↑5,5 | ↑5,9 | - | - |
| | RT-PCR (V1) | ↑6,7 | ↑4,9 | ↑9,4 | ↑7,9 | ↑7,9 | ↑6,2 |
| | RT-PCR (V2) | ↑7,0 | ↑7,6 | ↑10,0 | ↑5,2 | ↑4,2 | ↑3,4 |

Pfeile zeigen die Richtung der Expessionsänderung: ↑ heraufreguliert, ↓ herabreguliert, → keine veränderte Regulation

Dies bestätigte die durch das Microarray-Screening erhaltenen Daten. Ein gerichteter Einfluss der Verbindung (Natriumselenit oder Natriumselenat) sowie supranutritiver Dosierungen konnte nicht beobachtet werden.

Dass die PHGPx deutlich weniger und langsamer auf das Selenangebot reagiert, zeigt deren Expression, die im Gegensatz zur cGPx in den verschiedenen Versuchsgruppen nur tendenziell beeinflusst wurde (Tab. 17). Jedoch konnte weder durch einen alimentären Selenmangel noch durch unterschiedliche Selenverbindungen und Selenzulagehöhen ein gerichteter Einfluss, welcher mindestens zu einer Verdoppelung der Genexpression (Faktor ≥ 2,0) geführt hätte, aufgezeigt werden.

***Tabelle 17:*** *Genexpression der PHGPx ermittelt durch Microarray-Screening und RT-PCR in Versuch 1 und 2*

| Gen | Auswertung | x-fache Veränderung gegenüber Kontrolle Se 0 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Name | Gruppe | I | II | III | IV | V | VI |
| PHGPx (NM 0171651) | Microarray | ↑1,3* | ↑1,3* | ↑1,2* | ↑1,3* | - | - |
| | RT-PCR (V1) | ↓1,7 | ↑1,2 | ↑1,9 | ↑1,5 | ↑1,8 | ↓1,1 |
| | RT-PCR (V2) | ↓1,4 | ↓1,1 | ↑1,5 | ↑1,1 | →1,0 | ↑1,2 |

*Microarray-Daten erfüllten nicht die Voraussetzungen für $p < 0,05$ sowie Normalverteilung der Daten
Pfeile zeigen die Richtung der Expessionsänderung: ↑ heraufreguliert, ↓ herabreguliert, → keine veränderte Regulation

Des Weiteren wurde die Regulation der Thioredoxinreduktasen untersucht (Tab. 18 und 19). Hier zeigte sich in den zwei Versuchsdurchläufen ein ähnliches Regulationsmuster, allerdings auf unterschiedlichen Regulationsniveaus. So wurde die TrxR1 in Versuch 1 in den Gruppen I, II, III und V deutlich (≥ 2,0) im Vergleich zu der

Gruppe 0 heraufreguliert. Die verbleibenden Gruppen wiesen nur eine tendenzielle Heraufregulation auf, welche unterhalb des Faktors 2,0 lag. In Versuch 2 konnte ebenfalls eine Heraufregulation beobachtet werden. Die Gruppen I bis VI sind jedoch nur tendenziell heraufreguliert, d.h. die Faktoren lagen deutlich unter 2,0.

***Tabelle 18:*** *Genexpression der TrxR1 ermittelt durch Microarray-Screening und RT-PCR in Versuch 1 und 2*

| Gen | Auswertung | x-fache Veränderung gegenüber Kontrolle Se 0 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Name | Gruppe | I | II | III | IV | V | VI |
| TrxR1 (AF 2207611) | Microarray | ↑1,0* | ↑1,1* | ↑1,1* | ↑1,2* | - | - |
| | RT-PCR (V1) | ↑2,1 | ↑2,3 | ↑2,0 | ↑1,4 | ↑3,5 | ↑1,9 |
| | RT-PCR (V2) | ↑1,4 | ↑1,2 | ↑1,3 | ↑1,2 | ↑1,3 | ↑1,2 |

*Microarray-Daten erfüllten nicht die Voraussetzungen für $p < 0,05$ sowie Normalverteilung der Daten
Pfeile zeigen die Richtung der Expessionsänderung: ↑ heraufreguliert, ↓ herabreguliert, → keine veränderte Regulation

Bei der Expression der mitochondrialen TrxR (TrxR2) konnte in beiden Versuchsdurchläufen kein gerichteter Einfluss in den Selenzulagegruppen beobachtet werden. In den Gruppen I, II und III wurde die Expression bis zu einem Faktor von 2,3 herauf- bzw. 1,4 herunterreguliert. Die Gruppe IV wurde in Versuch 1 nicht reguliert und in Versuch 2 um den Faktor 2,5 heraufreguliert. In den Gruppen V und VI mit einer Selenzulagehöhe von 2,0 mg Se/kg Diät wurde die Genexpression in Versuch 1 und 2 heraufreguliert aber lediglich in Gruppe V des Versuchs 1 auf einem Niveau ≥ 2,0.

***Tabelle 19:*** *Genexpression der TrxR2 ermittelt durch Microarray-Screening und RT-PCR in Versuch 1 und 2*

| Gen | Auswertung | x-fache Veränderung gegenüber Kontrolle Se 0 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Name | Gruppe | I | II | III | IV | V | VI |
| TrxR2 (NM 0225841) | Microarray | ↑1,1* | ↑1,8* | ↑1,0* | ↑2,3* | - | - |
| | RT-PCR (V1) | ↓1,3 | ↓1,4 | ↑1,8 | →1,0 | ↑2,2 | ↑1,6 |
| | RT-PCR (V2) | ↑2,3 | ↑1,5 | ↑1,9 | ↑2,5 | ↑1,6 | ↑1,6 |

*Microarray-Daten erfüllten nicht die Voraussetzungen für $p < 0,05$ sowie Normalverteilung der Daten
Pfeile zeigen die Richtung der Expessionsänderung: ↑ heraufreguliert, ↓ herabreguliert, → keine veränderte Regulation

Die Microarray Daten der GST A2 (Tab. 20) als Zellschutzparameter weisen auf eine deutliche Herabregulation in den selenversorgten Gruppen hin. Dieser Effekt konnte in Versuch 1 durch PCR-Analyse nicht bestätigt werden. Denn hier sind die Gruppen IV, V und VI mit einem Faktor deutlich unter 2,0 lediglich tendenziell herabreguliert, während die Gruppen I, II nicht reguliert bzw. Gruppe III marginal reguliert wurde. In

Versuch 2 konnte in den Gruppen I und II eine Herabregulation der Expression beobachtet werden. Der Faktor der Gruppe I lag jedoch mit 1,7 unterhalb des ≥ 2,0 Niveaus. Die verbleibenden Gruppen III, IV, V und VI wurden im Vergleich zu der Selenmangelgruppe mit einem Faktor von maximal 1,5 in Gruppe VI ebenfalls nur tendenziell herunterreguliert.

***Tabelle 20:*** *Genexpression der GST A2 ermittelt durch Microarray-Screening und RT-PCR in Versuch 1 und 2*

| Gen | Auswertung | x-fache Veränderung gegenüber Kontrolle Se 0 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Name | Gruppe | I | II | III | IV | V | VI |
| GST A2 (NM 0170131) | Microarray | ↓2,5 | ↓2,3 | ↓2,5 | ↓2,4 | - | - |
| | RT-PCR (V1) | →1,0 | →1,0 | ↑1,1 | ↓1,4 | ↓1,1 | ↓1,1 |
| | RT-PCR (V2) | ↓1,7 | ↓2,2 | ↓1,3 | ↓1,1 | ↓1,4 | ↓1,5 |

Pfeile zeigen die Richtung der Expressionsänderung: ↑ heraufreguliert, ↓ herabreguliert, → keine veränderte Regulation

### 4.7.2 Weitere exprimierte Gene in der Leber

Das Microarray-Screening offenbarte, dass die alimentäre Verabreichung von Natriumselenit oder Natriumselenat an Ratten über einen Zeitraum von acht Wochen sich sehr unterschiedlich auf die differenzielle Genexpression auswirkt (Tab. 21 und 22). Hierbei erfolgte die Auswertung der Microarraydaten bei einem 5% Fehlerintervall und ab Expressionsunterschieden von einem Faktor ≥ 2,5 gegenüber der Kontrollgruppe (Selenzulage 0).

***Tabelle 21:*** *Genexpression ausgewählter Gene aus dem Gebiet der zellulären Detoxifikation und des Xenobioticametabolismus ermittelt durch Microarray-Screening in Versuch 1*

| Name | Regulation | x-fache Veränderung gegenüber Kontrolle Se 0 Faktor ≥ 2,5 (p < 0,05) | |
|---|---|---|---|
| | | Natriumselenit | Natriumselenat |
| *Zelluläre Detoxifikation, Xenobioticametabolismus* | | | |
| aflatoxin b1 aldehyde reductase; Akr7a3 (NM 0132151) | ↓ | 3,6 | 3,6 |
| glutathione-s-transferase A2; GST $Y_a$ subunit; GST alpha type ($Y_c$?); GST A2 (NM 017013) | ↓ | 2,5 | (2,4) |
| cytosolic glutathione peroxidase; cGPx (NM 0308261) | ↑ | 6,2 | 6,3 |

Pfeile zeigen die Richtung der Expressionsänderung: ↑ heraufreguliert, ↓ herabreguliert, → keine veränderte Regulation

So führte die Zulage beider Selenverbindungen im Bereich der zellulären Detoxifikation zu einer Expressionszunahme der cGPx und zu einer Abnahme der Aflatoxin B1-Aldehydreduktase (NM 0132151) sowie Glutathion-S-Transferase A2 (NM 017013).

Die Gene jedoch, welche im Zusammenhang mit Funktionen des Zellzyklus stehen, wurden ausschließlich von Natriumselenat beeinflusst (Tab. 22). Natriumselenatgaben führten u.a. zu einer Herabregulation eines Disintegrins (NM 0244001), dessen Expression zu einer Begünstigung der Tumorbildung führt (LIU et al. 2005).

***Tabelle 22:*** *Genexpression ausgewählter Gene aus den Gebieten Zellzyklus, Apoptose und Krebs ermittelt durch Microarray-Screening in Versuch 1*

| Name | Regulation | x-fache Veränderung gegenüber Kontrolle Se 0 Faktor ≥ 2,5 (p < 0,05) | |
|---|---|---|---|
| | | Natriumselenit | Natriumselenat |
| *Zellzyklus, Apoptose, Krebs* | | | |
| a disintegrin and metalloprotease domain 3; ADAM3 (NM 0203021) | ↑ | * | 3,0 |
| a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS1 (NM 0244001) | ↓ | * | 2,5 |
| ubiquitin specific processing protease; Usp2 (NM 0537741) | ↓ | * | 2,8 |
| jagged2 precursor; Jag2 (U 700501) | ↑ | * | 3,0 |
| bcl2-antagonist/killer 1; Bak1 (NM 0538121) | ↑ | * | 3,0 |
| cenexin 2; Odf2 (AF 1627561) | ↑ | * | 3,7 |
| polo-like kinase 2; Plk2 (NM 0318211) | ↑ | * | 6,7 |
| dead box protein 1; Ddx1 (AF 2227331) | ↑ | * | 4,9 |
| alphab crystallin-related protein; HSP20 (D 299601) | ↑ | * | 5,0 |
| protein kinase; Chk2 rad53 (NM 0536771) | ↑ | * | 2,9 |

*keine signifikante (p < 0,05) Veränderung gegenüber Se 0
Pfeile zeigen die Richtung der Expessionsänderung: ↑ heraufreguliert, ↓ herabreguliert, → keine veränderte Regulation

Des Weiteren wurde in den mit Natriumselenat versorgten Ratten der Bcl2-antagonist/killer 1 (NM 0538121), welcher an der Regulation der Apoptose beteiligt ist, um den Faktor 3,0 und die Protein-Kinase Chk2 (NM 0536771) um den Faktor 2,9 heraufreguliert. Dieses Gen ist an der Erkennung und Regulation von DNA-Schäden beteiligt. Darüber hinaus führte nur die Zulage von Natriumselenat zu einer signifi-

kanten Regulation der Expression von ADAM3 (NM 0203021), Usp2 (NM 0537741), Jag2 (U 700501), Odf2 (AF 1627561), Ddx1 (AF 2227331), Plk2 (NM 0318211) und HSP20 (D 299601).

# 5 Diskussion

## 5.1 Lebendmasseentwicklung, Futteraufnahme und Futterverwertung

Zootechnische Parameter, die die Lebendmasseentwicklung, Futteraufnahme und Futterverwertung umfassen, wurden in der Vergangenheit in einer Vielzahl von Studien zur Untersuchung der biochemischen Funktion von Selen ermittelt.

Die folgenden Autoren beschreiben einen Einfluss von Selen auf die Lebendmasseentwicklung bei Versuchstieren:

YEH et al. (1997) prüften in zwei Versuchen den Einfluss von Selen in Form von Natriumselenit auf die Selenoprotein W-Gehalte bei der Ratte. Neben einer Selenmangelgruppe wurden Tiere mit Selenzulagen zwischen 0,01 und 4,0 mg Se/kg Diät über einen Zeitraum von 6 bzw. 8 Wochen gefüttert. Es konnten keine signifkanten Unterschiede in der Futteraufnahme ermittelt werden. Die Lebendmasseentwicklung jedoch war für die Tiere der Selenmangelgruppe sowie für Tiere, die Selenzulagen unterhalb einer Versorgungsstufe von 0,03 mg Se/kg Diät erhielten, signifkant niedriger. Die Lebendmasseentwicklung bei Tieren, die die höchste, weit über der empfohlenen Versorgungsstufe liegende Selenmenge von 4,0 mg Se/kg Diät erhielten, unterschied sich nur bei dem 6-wöchigen Versuch signifkant von der Selenmangelgruppe.
In einem 10-wöchigen Versuch (WYCHERLY et al. 2004) mit dem Ziel, durch Natriumselenit verursachte DNA-Schäden zu untersuchen, wurde ebenfalls die Lebendmasseentwicklung der Versuchsgruppen, die mit einer Selenmangeldiät oder Selenzulagen von 0,15 und 2,0 mg Se/kg Diät versorgt wurden, erfasst. Auch hier hatten die adäquat versorgten Tiere (0,15 mg Se/kg Diät) höhere Lebendmassezunahmen als die Tiere der Selenmangelgruppe und der supranutritiv versorgten Gruppe (2,0 mg Se/kg Diät). Dieser Unterschied war jedoch lediglich zwischen der adäquat versorgten Gruppe und der Selenmangelgruppe statistisch belegbar.
WHANGER und BUTLER (1988) verglichen in einer Studie den Einfluss von Natriumselenit und Selenomethionin auf die Aktivität der GPx. Das Versuchsdesign sah eine Selenmangelgruppe sowie Selenzulagegruppen mit 0,2; 1,0; 2,0; und 4,0 mg Se/kg Diät vor. Die Lebendmassezunahmen am Ende des 9-wöchigen Versuches zeigten signifkant geringere Zunahmen bei der Selenmangelgruppe im Ver-

gleich zu den selenversorgten Tieren. Dabei wiesen die Selenmangeltiere auch eine geringere Futteraufnahme als die der Selenzulagegruppen auf.

Andere Studien hingegen konnten keinen gerichteten Einfluss der Selenversorgung auf die Gewichtsentwicklung der Versuchstiere beobachten:

CHRISTENSEN et al. (1995) fütterten Ratten mit einer Selenmangeldiät oder mit Selenzulagen von 0,1 oder 2,0 mg Se/kg Diät in Form von Natriumselenit, um die gewebsspezifische Expression verschiedener Selenoproteine zu ermitteln. Im Versuchszeitraum von 13 Wochen zeigte die Lebendmasseentwicklung keine signifkanten Unterschiede zwischen den Gruppen.
Die Zulage von 0,1 oder 1,0 mg Se/kg Diät wirkte sich in einer Studie von BERGGREN et al. (1999), die sich mit dem Einfluss von Selen auf die TrxR-Aktivität beschäftigte, im Vergleich zu einer Selenmangelgruppe nicht auf die Gewichtsentwicklung der Tiere aus.

Trotz einer ähnlichen Ausrichtung aller oben beschriebenen Studien zeigten die Versuchsgruppen keine übereinstimmende Gewichtsentwicklung in Abhängigkeit von der Selendosis. Allerdings ist die Beurteilung schwierig, da Informationen zum Selenausgangsstatus und umfassende zootechnische Parameter zur Beurteilung der Daten vielfach fehlen.

Bei den zwei Versuchen in der vorliegenden Arbeit zum Einfluss von Natriumselenat und Natriumselenit konnten in Versuch 1 zwischen den Versuchsgruppen statistisch keine Unterschiede in Bezug auf die $LMZ_G$ erfasst werden. In Versuch 2 hingegen waren die $LMZ_G$ für die adäquat versorgten Gruppen I und II (0,2 mg Se/kg Diät) signifikant ($p < 0,05$) höher als in der Selenmangelgruppe. Die supranutritiv versorgten Gruppen zeigten in Versuch 2 ebenfalls ein niedrigeres Endgewicht, welches gegenüber den adäquatversorgten Gruppen teilweise abgesichert werden konnte.
Die Verfütterung einer selenarmen Basisdiät mit einem Mindestgehalt an Vitamin E reduziert eventuell die Nährstoffverwertung und beeinträchtigt die Lebendmasseentwicklung. HONG und CHOW (1988) konnten in einem 9-wöchigen Versuch mit Ratten, die eine Selen- und Vitamin E-Mangeldiät erhielten, das Auftreten einer eosinophilen Enteritis beobachten. Diese Erkrankung wurde durch die Zulage von

100 mg DL-Tocopherylacetat/kg Diät oder 0,1 mg Se/kg Diät behoben. Eine solche Erkrankung führt beim Menschen zu unspezifischen Symptomen wie Übelkeit, Erbrechen, Abdominalkrämpfen und Durchfall (LYNBAEK et al. 2006). In dem hier beschriebenen Tierversuch mit einem Mindestgehalt von 18 I.E. Vitamin E konnte jedoch weder am Verhalten der Tiere, bei der Beurteilung der inneren Organe noch an der hier erfassten FV ein Hinweis auf das Vorliegen einer solchen Störung gefunden werden. Die Ermittlung einer genauen Vitamin E-Konzentration wäre hier von Interesse, da die Möglichkeit besteht, dass bereits Konzentrationen unter 100 mg DL-Tocopherylacetat/kg Diät ein solches Krankheitsbild in einer Selenmangelsituation verhindern.

In weiteren in der Literatur beschriebenen Studien wurde eine Wachstumsdepression als Symptom eines Selenmangels identifiziert. Jedoch konnte erst in Selenmangelratten der zweiten Generation eine massive Wachstumsdepression ausgelöst werden (THOMPSON et al. 1995, 1998; MORENO-REYES et al. 2001). Diese äußerte sich in geringeren Lebendmassezunahmen sowie einem reduzierten Knochenwachstum. Bei den in dieser Untersuchung eingesetzten HK 51 Albinoratten handelt es sich nicht um Selenmangelratten der zweiten Generation. Es steht daher in Einklang mit THOMPSON et al. (1995, 1998) und MORENO-REYES et al. (2001), dass in der vorliegenden Studie keine oder deutlich geringere Unterschiede in der $LMZ_G$ zwischen Mangelgruppe und adäquat versorgter Gruppe (0,2 mg Se/kg Diät) auftraten.

Die Zulage supranutritiver Selengaben führte in Versuch 2 zu einer fortschreitenden Abnahme der $LMZ_G$ innerhalb der Versuchsgruppen III-VI. Dies ist zwar statistisch nicht vollständig absicherbar, sollte aber als Beobachtung festgehalten werden. THORLACIUS-USSING (1987, 1990) und GRONBAEK et al. (1995) konnten demonstrieren, dass die Verabreichung toxischer Selenitgaben (3,0-5,0 ppm) zu einem verminderten allgemeinen Wachstum und zu Knochenwachstumsstörungen führt. In der hier vorliegenden Arbeit wurde jedoch nur die fünffache bzw. zehnfache Menge des Selenbedarfs verabreicht. Dabei kann noch nicht von toxischen Selengaben gesprochen werden (NRC 2005).

Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Selenmangeldiät bzw. die Diäten mit einer supranutritiven Selenzulage bei den Ratten bereits zu allgemeinem Unwohlsein und Übelkeit geführt haben. Erlernte Geschmacksaversionen bei Mangelkrankheiten und Intoxikationen konnten in der Fachliteratur vielfach belegt

werden (LANGHANS 1986). So konnten ZUBERBUEHLER et al. (2002) als Folge eines Selenmangels bei Legehennen eine Aversion gegenüber der Selenmangeldiät beobachten. Dies äußerte sich durch eine reduzierte Futteraufnahme. Bei anschließender Wahlmöglichkeit zwischen der Selenmangeldiät und einer supplementierten Diät präferierten die Legehennen die Diät, welche mit Selen supplementiert worden war. Eine Studie von EWAN (1976) konnte demonstrieren, dass das reduzierte Wachstum von Selenmangelratten der zweiten Generation teilweise auf eine reduzierte FA zurückzuführen war, denn eine Reduktion der Futteraufnahme der selensupplementierten Tiere auf das Niveau der Mangeltiere führte zu vergleichbaren LMZ. Eine aversionsbedingte Reduktion der FA hätte in der hier vorliegenden Studie allerdings schon in Versuch 1 auftreten müssen.

Eine abschließende Aussage zum Einfluss von Selen auf die Lebendmasseentwicklung lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht machen, denn die Ergebnisse aus Versuch 1 und Versuch 2 lassen sich nicht ausschließlich auf die Selenversorgung zurückführen. Es fällt auf, dass die ad libitum Fütterung in Versuch 2 zu einer verstärkten FA in den adäquat versorgten Gruppen I und II, bei gleicher FV aller Versuchsgruppen und daraus resultierend höheren TZ führte. Damit ist neben der Selenversorgung der Faktor individuelle FA für die unterschiedliche Gewichtsentwicklung von Bedeutung. Nur ein Ausschluss des Faktors Futteraufnahme auf die Lebendmasseentwicklung durch eine kontrollierte FA (pair feeding) könnte in weiteren Versuchsreihen Aufschluss über den Einfluss von Selen auf die Lebendmasseentwicklung geben.

## 5.2 Überprüfung des Se-Status anhand der Se-Gehalte in Leber und Plasma

Die Selendepletion in den Gruppen 0 ist mit einem signifikanten Abfall der Selenkonzentration in Leber (20 μg Se/kg) und Blutplasma (26 μg Se/kg) verbunden. Die Zulage von 0,2-2,0 mg Se/kg Diät führte in Leber und Plasma zu einer steigenden Akkumulation von Selen, die für beide anorganischen Selenverbindungen als effizient zu bezeichnen ist. Allerdings tritt ab einer Selenzulage von 1,0 mg/kg Diät im Plasma bereits eine Sättigung der Selenkonzentration auf (Abb. 8).

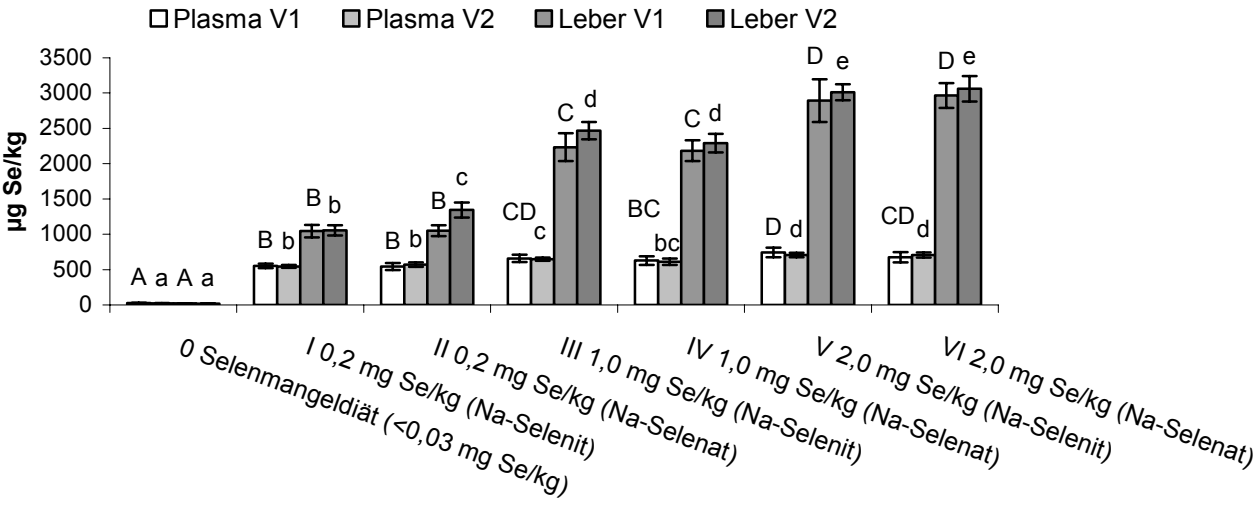



***Abbildung 8:*** *Einfluss unterschiedlicher Selenversorgung auf die Selenkonzentration in der Leber und im Plasma der Ratten [Versuch 1 (A,B,C,D) und Versuch 2 (a,b,c,d,e)] nach 8-wöchiger Versuchsdauer*

Die Überprüfung des Selenstatus anhand der Selenkonzentration in der Leber wurde ausgewählt, da Selen in diesem Organ gespeichert wird. Weiter werden zahlreiche Selenoproteine in der Leber als zentralem Stoffwechselorgan des Organismus synthetisiert (DREHER et al. 1997). Dies spiegeln die hohen Selenkonzentrationen der Leber im Vergleich zu anderen Organen der Ratte wider (BEHNE und WOLTERS 1983).

Das Blutplasma wiederum ist das dazugehörige Transportsystem, es reagiert auch kurzfristig auf Veränderungen des Selenhaushaltes (BEHNE und WOLTERS 1983, ULLREY 1987, HERDT et al. 2000). Die effiziente Aufnahme von Selenit und Selenat aus dem Gastrointestinaltrakt wurde bereits in verschiedenen Bilanzstudien beschrieben (WOLFFRAM et al. 1985, 1989; MYKKANEN und WASSERMAN 1989, VENDELAND et al. 1992a). Auch die hier vorliegenden Untersuchungen bestätigen, dass Selenit und Selenat vergleichbar effizient durch das Blutplasma aufgenommen und in der Leber gespeichert werden.

Zwei Studien, die sich mit der optimalen Selenversorgung zur maximalen Expression und Aktivität von Glutathionperoxidasen beschäftigten, erfassten ebenfalls die angesprochenen Selenstatusparameter. LEI et al. (1995) fütterten Laborratten mit Selenkonzentrationen zwischen 0 und 0,19 mg Se/kg Diät in Form von Natriumselenit. Die steigenden Selengehalte in der Diät führten hier zu einem signifikanten Anstieg der

Selenkonzentration in den Lebern der Versuchstiergruppen von 13 μg Se/kg in der Selenmangelgruppe auf 532 μg Se/kg in der adäquat versorgten Gruppe.
In einer Studie mit zwei 5-wöchigen Versuchen an Schweinen verschiedener Altersstufen (LEI et al. 1998), die Diäten mit Selenkonzentrationen zwischen 0 und 0,5 mg Se/kg Diät erhielten, konnte diese Reaktion im Blutplasmas statistisch abgesichert werden. Die gestaffelten Selenzulagen führten zu einem Anstieg der Selenkonzentration im Blutplasma von 14 μg Se/kg im Selenmangel auf 128 μg Se/kg bei einer Zulage von 0,3 mg Se/kg Diät.
WHANGER und BUTLER (1988) verglichen in einer Studie den Einfluss von Natriumselenit und Selenomethionin auf die Aktivität der GPx. Das Versuchsdesign sah eine Selenmangelgruppe sowie Selenzulagegruppen mit 0,2; 1,0; 2,0; und 4,0 mg Se/kg Diät vor. Die supranutritiven Zulagen, die das 5, 10 und 20-fache des Bedarfs umfassten, führten im Vollblut sowie in der Leber zu einer weiteren signifikanten Akkumulation von Selen. Während die Selenmangelgruppe Selengehalte von 20 μg Se/kg in der Leber aufwies, erreichte die Gruppe mit einer Zulage von 2,0 mg Se/kg Diät (als Na-Selenit) eine Selenkonzentration von 1030 μg Se/kg.

Durch die Bestimmung der Selenkonzentrationen im Blutplasma und in der Leber konnte in der hier vorliegenden Studie eindeutig eine Selenmangelsituation bei den Ratten, die die Basisdiät erhielten, nachwiesen werden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen konnte ferner die Speicherfunktion der Leber anhand der Selen-Akkumulation demonstriert werden. Die Selensättigungskurve im Blutplasma zeigt darüber hinaus, dass ab einer Selenzulage von 1,0 mg Se/kg Diät nahezu maximale Selenaufnahmekapazitäten erreicht wurden.

## 5.3 Aktivität und Expression von Selenoenzymen

Die Synthese von Selenoenzymen ist abhängig von der Verfügbarkeit von Selen und erfolgt nach einer strengen Hierarchie, die vermutlich die biologische Bedeutung der Enzyme widerspiegelt (FLOHÉ et al. 1997, BRIGELIUS-FLOHÉ 1999). Hierbei führt ein Selenmangel zu einem Stabilitätsverlust der mRNA und zu einer Abnahme der Enzymaktivität. Steigende Selenzulagen führen zu einem graduellen Anstieg der Genexpression und der Enzymaktivität bis zur Bildung eines Plateaus bei einer adäquaten Versorgungsstufe. Bei extremer Überversorgung, d.h. toxischen Selengaben kann erneut ein Verlust der Enzymaktivität bei gleichzeitig abnehmenden

mRNA-Gehalten beobachtet werden. Dies kann durch eine gestörte Proteinsynthese als Folge von Zellschädigungen durch exzessive Selengaben erklärt werden (CHRISTENSEN und BURGENER 1992, WEISS et al. 1996, GAN et al. 2002).

In dieser Arbeit wurden die beiden anorganischen Selenverbindungen Natriumselenat und Natriumselenit jeweils bis zu einer Selenzulage von 2,0 mg Se/kg Diät eingesetzt und mit einer Selenmangelgruppe als Kontrolle verglichen. Dabei wurden Genexpression und Enzymaktivität wichtiger Selenoenzyme aus der Familie der Glutathionperoxidasen und Thioredoxinreduktasen bestimmt.

*pGPx und cGPx*

Den Selenoenzymen pGPx und cGPx wird in der Hierarchie ein niedriger Rang zugewiesen. Sowohl die mRNA-Stabilität als auch die Enzymaktivität dieser beiden Selenoenzyme reagieren sehr sensibel auf eine veränderte Selenversorgung. Sie finden daher häufig als Selenstatusparameter Verwendung.

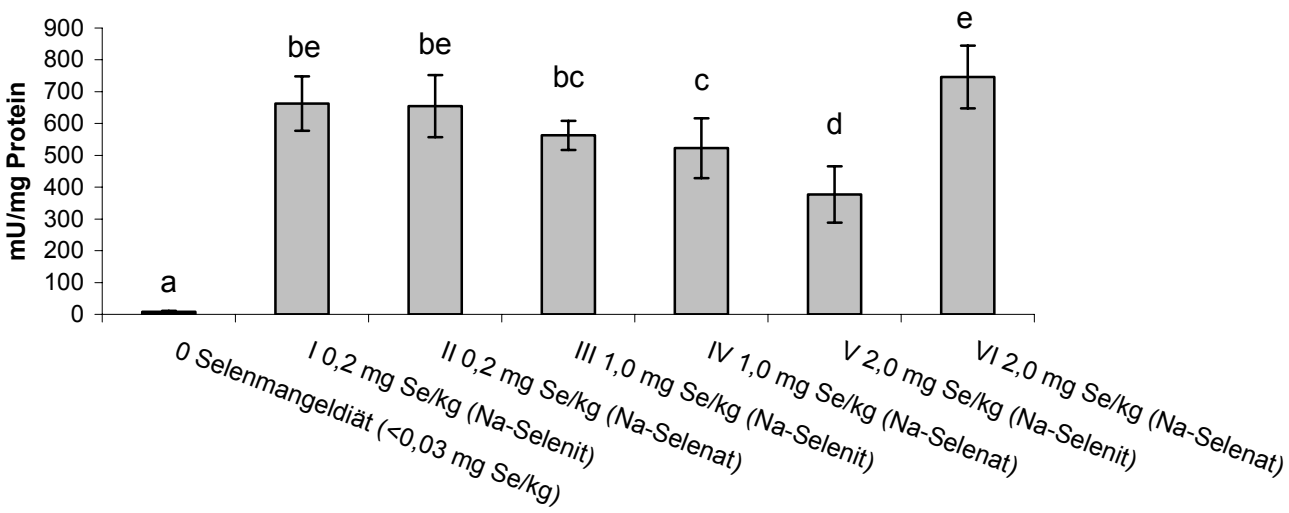



***Abbildung 9:*** *Einfluss unterschiedlicher Selenversorgung auf die Aktivität der cGPx (Versuch 1) in der Rattenleber nach 8-wöchiger Versuchsdauer*

Die beiden Versuche in dieser Arbeit bestätigen frühere Beobachtungen (LEI et al. 1995, CHRISTENSEN et al. 1995, BERGGREN et al. 1999). Im Durchschnitt fiel in der Kontrollgruppe die Enzymaktivität der pGPx auf 1,6% und die der cGPx in der Leber auf 1,3% (Abb. 9) des Wertes der selenversorgten Gruppen ab. Eine

Selenversorgung oberhalb der empfohlenen Versorgungsstufe von 0,2 mg Se/kg Diät führte zu keinem weiteren Anstieg der GPx-Aktivität.

Die Genexpression der cGPx stieg in selenversorgten Gruppen um das 3,4- bis 10-fache gegenüber der Selenmangelgruppe an (Abb. 10). CHRISTENSEN et al. (1995) und WYCHERLEY et al. (2004) untersuchten ebenfalls die Aktivität und Expression der cGPx bei einer supranutritiven Selenversorgung von 2,0 mg Se/kg Diät mit Natriumselenit. Ihre Untersuchung zeigte zwar keine signifikanten Unterschiede zwischen der cGPx-Aktivität der adäquat und der supranutritiv versorgten Gruppen, jedoch konnten WYCHERLEY et al. eine Abnahme der Expression bei gleichzeitiger Zunahme eines DNA-Schädigungsparameters beobachten, während bei CHRISTENSEN et al. (1995) keine Reduktion der Genexpression zu verzeichnen war.

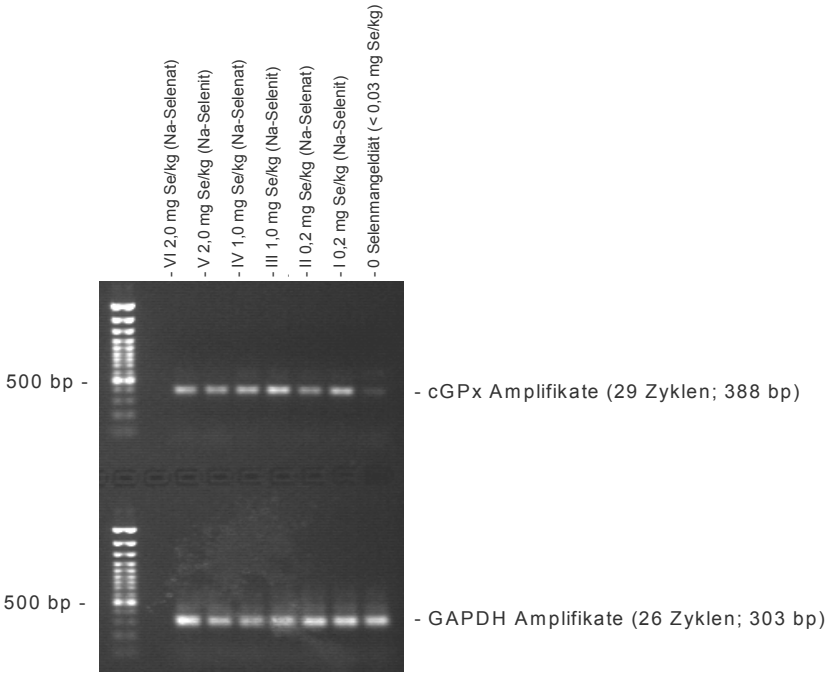



***Abbildung 10:*** *Einfluss unterschiedlicher Selenversorgung auf die Genexpression der cGPx (Versuch 1) in der Rattenleber nach 8-wöchiger Versuchsdauer*

Die in Abbildung 9 für Versuch 1 dargestellte auffällige Abnahme der cGPx-Aktivität in der Leber bei einer Selenzulage von 2,0 mg Se/kg Diät als Natriumselenit (Gruppe V) trat in beiden Versuchsdurchläufen auf, lässt sich jedoch anhand der bestimmten Parameter nicht eindeutig erklären. So ist die Genexpression der cGPx zwar mit

einer gewissen Variation verbunden, jedoch ist diese nicht in Übereinstimmung mit den beobachteten Enzymaktivitäten zu bringen.
Eine Untersuchung der Proteinexpression könnte hier weiteren Aufschluss bieten. Des Weiteren sind pGPx und PHGPx, die ähnliche Enzymsysteme (siehe 5.3) darstellen, von diesem Phänomen nicht betroffen. Ein Blick auf die gemessenen Zellschutz- und Schädigungsparameter (siehe 5.4 und 5.5) zeigt ebenfalls keine eindeutigen Hinweise auf ein verändertes Redoxgleichgewicht oder eine erhöhte Gewebeschädigung, die beispielsweise durch eine Selenintoxikation hervorgerufen werden könnte.

*PHGPx*

Die Untersuchung der PHGPx auf Ebene der Enzymaktivität (Abb. 11) und der Genexpression (Abb. 12) veranschaulicht, dass die PHGPx in der Hierarchie der Selenoenzyme einen hohen Rang einnimmt. Auf einen Selenmangel reagiert die PHGPx mit einer nahezu unveränderten Genexpression und einem Verlust an Enzymaktivität, der im Gegensatz zu der cGPx und pGPx in der Selenmangelgruppe lediglich halbiert wird.

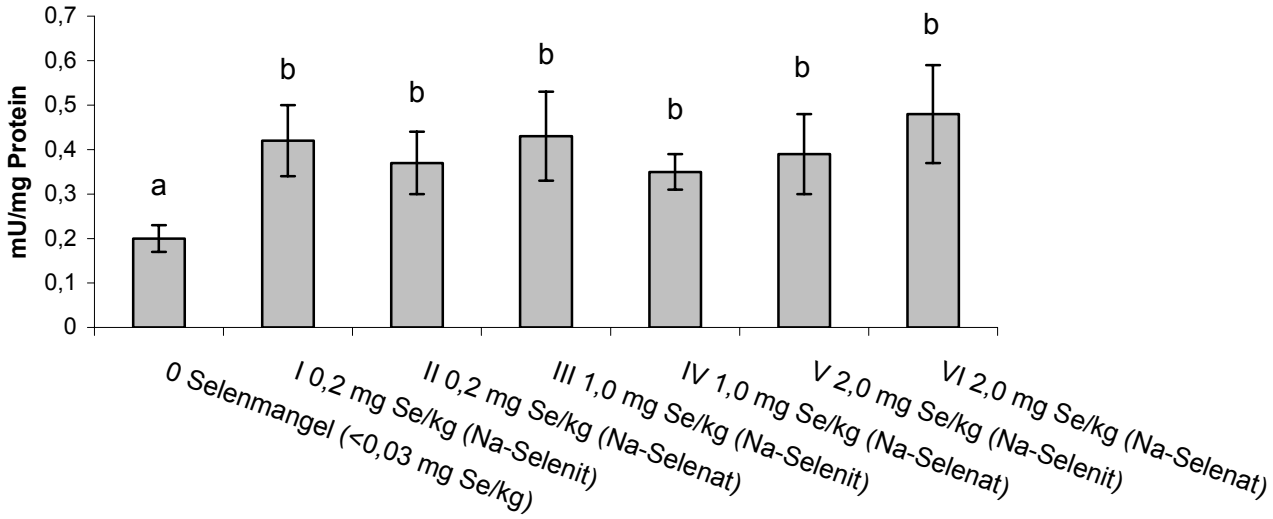



***Abbildung 11:*** *Einfluss unterschiedlicher Selenversorgung auf die Aktivität der PHGPx (Versuch 2) in der Rattenleber nach 8-wöchiger Versuchsdauer*

Diese Beobachtungen werden durch eine Reihe von Studien bestätigt, die den Einfluss der Selenversorgung auf die PHGPx untersucht haben. So konnte im

Selenmangel ein Abfall der Enzymaktivität auch bei WEITZEL et al. 1990, LEI et al. 1997, WEISS SACHDEV und SUNDE 2001 auf durchschnittlich 50% der Aktivität selenversorgter Tiere beobachtet werden.

SUNDE et al. (1993), LEI et al. (1995) und HADLEY und SUNDE (2001) untersuchten die Wirkung von Selen auf die Regulation der mRNA und Enzymaktivität bei der PHGPx. Die Verabreichung einer Selenmangeldiät sowie von Diäten mit adäquater Selenversorgung (als Na-Selenit) zeigten übereinstimmend lediglich geringfügige Veränderungen der mRNA-Gehalte in der Leber.

Über das Ergebnis früherer Studien hinaus konnte gezeigt werden, dass die Selenversorgung mit unterschiedlichen anorganischen Selenverbindungen in supranutritiven Dosierungen keinen weiteren Anstieg der Enzymaktivität oder Genexpression der PHGPx bewirken kann.

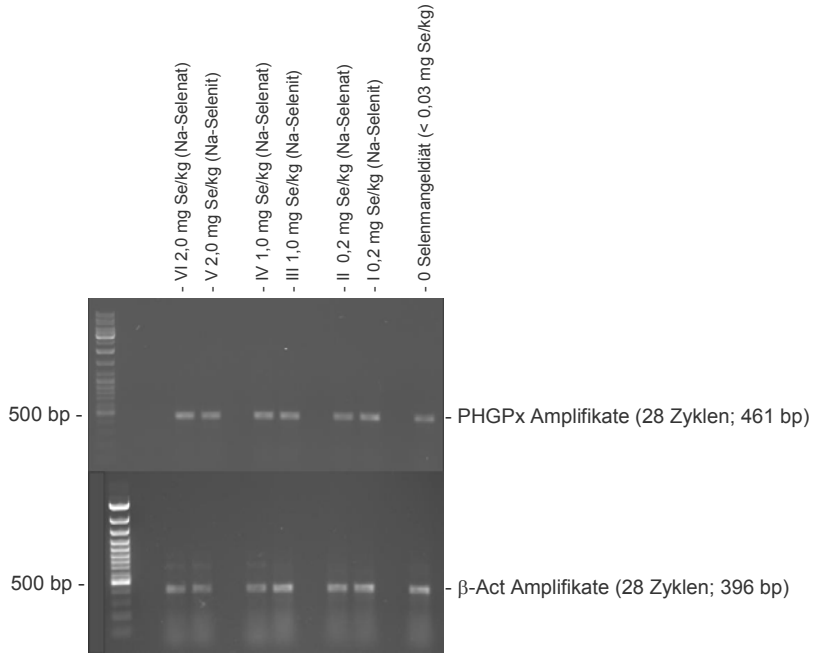



***Abbildung 12:*** *Einfluss unterschiedlicher Selenversorgung auf die Genexpression der PHGPx (Versuch 2) in der Rattenleber nach 8-wöchiger Versuchsdauer*

*TrxR1 und TrxR2*

Die Funktion des Thioredoxin-System bestehend aus Thioredoxin, Thioredoxinreduktase und NADPH beruht auf einem Thiol-Disulfid-Austauschmechanismus, der in nahezu allen Organismen vorkommt. Dieses System übernimmt zahlreiche Auf-

gaben, die u.a. in Zusammenhang mit dem Redoxgleichgewicht der Zelle stehen. Bis heute konnten zahlreiche Isoformen der TrxR identifiziert werden (siehe 2.1.5.4). Die TrxR1 jedoch ist die am besten charakterisierte Thioredoxinreduktase (LEE et al. 1999, ARNÉR und HOLMGREN 2000).

HADLEY und SUNDE (2001) untersuchten den Einfluss von Selen auf die Aktivität und mRNA-Gehalte der TrxR1 in der Leber unter Selenmangelbedingungen und bei steigenden Zulagehöhen bis 0,3 mg Se/kg Diät in Form von Natriumselenit über einen Zeitraum von 28 Tagen. Die Aktivität der TrxR1 fiel im Selenmangel auf 16% der adäquat versorgten Tiere ab. Diese Beobachtung machten auch BERGGREN et al. (1999) in einem 100-tägigen Versuch mit Ratten, welche eine Selenmangeldiät oder eine adäquat bzw. supranutritiv mit Selen supplementierte (0,1 bzw. 1,0 mg Se/kg Diät als Na-Selenit) Diät erhielten.

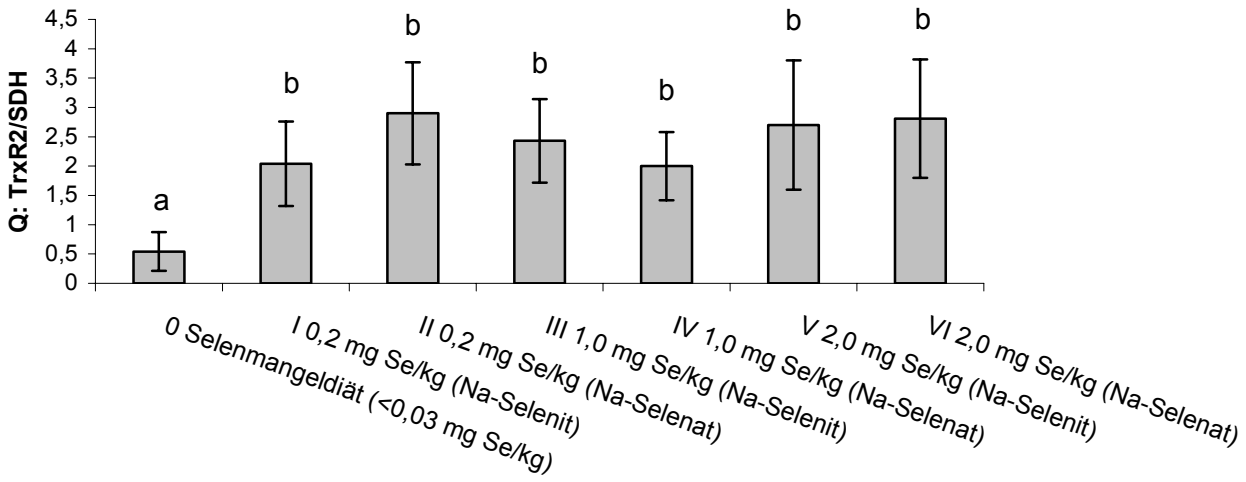



***Abbildung 13:*** *Einfluss unterschiedlicher Selenversorgung auf die Aktivität der TrxR2 (Versuch 1) in der Rattenleber nach 8-wöchiger Versuchsdauer*

Neben der TrxR1 wurde in Versuch 1 auch die Aktivität der TrxR2 (Abb. 13) ermittelt. Übereinstimmend verlieren diese zwei Selenoenzyme in der selenmangelversorgten Gruppe 0 an Enzymaktivität und erreichen am Ende des Fütterungsversuches Aktivitäten, die durchschnittlich bei 26% bzw. 20% im Vergleich zur selenversorgten Gruppe liegen. Dies bestätigt die mittlere Position der TrxRs in der Hierarchie der Selenoenzyme.

Die supranutritive Zulage von 1,0 mg Se/kg Diät führte bei der Verlaufsstudie von BERGGREN et al. (1999) zu einem signifikanten Anstieg der TrxR-Aktivität, die jedoch bereits nach 20 Tagen in der Leber wieder abnahm und nach 40 Tagen auf Aktivitäten der Kontrollgruppe zurückfiel. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich zwischen den supranutritiv versorgten Gruppen nach 56 Tagen Versuchsdauer im Vergleich zu den adäquat versorgten Versuchsgruppen keine signifkanten Unterschiede für die Aktivitäten von TrxR1 und TrxR2.

HADLEY und SUNDE (2001) konnten für die TrxR1-Aktivität und die mRNA-Expression bei einer stufenweise ansteigenden Selenzulage (0,02-0,3 mg Se/kg Diät) einen „breakpoint“ für die Enzymaktivität bei 0,07 mg Se/kg Diät und für die mRNA-Expression bei 0,05 mg Se/kg Diät ermitteln.
Eine Überversorgung mit 40 μg Se/kg LM $d^{-1}$ führte in einer Studie von GAN et al. (2002) zu einer signifkanten Abnahme der TrxR-Enzymaktivität und mRNA-Expression.

Die Daten des Microarray und der PCR (Abb. 14) zeigen, dass für die Zulage von Selen zwischen 0,2 und 2,0 mg Se/kg Diät in beiden Versuchdurchläufen kein gerichteter Effekt des Selens, unabhängig von der Verbindung, nachweisbar ist. Dies ist möglicherweise auf die gewählten Selenzulagehöhen zurückzuführen (siehe dazu auch Versuchsplan 3.1). So liegen die adäquat versorgten Gruppen weit über dem „breakpoint“ von 0,05 mg Se/kg Diät und die supranutritiven mit maximal 2,0 mg Se/kg Diät unterhalb einer toxischen Zulage. Die weitreichende Funktion des Thioredoxin-Systems im Organismus könnte daher auch selenunabhängige Expressionsunterschiede erklären. So könnten bereits die Veränderungen im Redoxsystem, wie sie hier anhand des Glutathionmetabolismus (siehe 5.4), der TBA-RS (siehe 5.5) und der Akkumulation von Selen in der Leber (siehe 5.2) beobachtet werden, die Expression der TrxR beeinflussen. Denn das Thioredoxinsystem ist u.a. an der Reduktion von Selenit und Lipidhydroperoxiden beteiligt (BJÖRNSTEDT et al. 1995a, 1995b). Künftige Untersuchungen mit Selen in Stufen zwischen 0 und 0,2 mg Se/kg könnten dabei den Übergang von einer selenabhängigen zu einer selenunabhängigen Genexpression hervorheben.

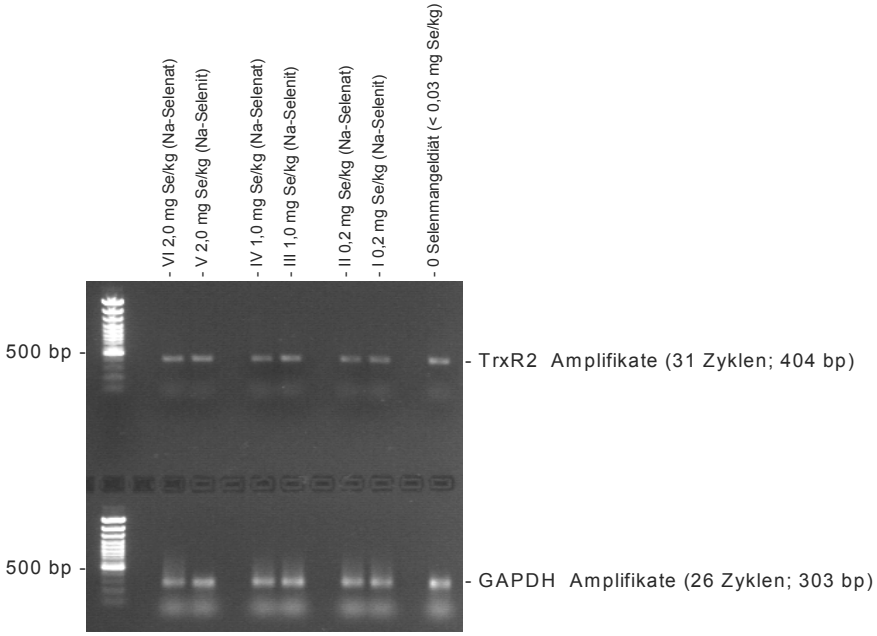



***Abbildung 14:*** *Einfluss unterschiedlicher Selenversorgung auf die Genexpression der TrxR2 (Versuch 1) in der Rattenleber nach 8-wöchiger Versuchsdauer*

## 5.4 Glutathionmetabolismus und selenunabhängige Glutathionperoxidase

*Glutathion und Glutathionreduktase*

Die intrazelluläre Glutathionkonzentration kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Zu diesen gehört unter anderem auch der Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (RAHMAN et al. 1996). Die Induktion eines Selenmangels sowie einer Selentoxizität führt durch den Verlust von Selenoproteinen vor allem der cGPx bzw. durch eine Überschreitung der Enzymkapazitäten des zellulären Schutzes zum Anstieg des intrazellulären $H_2O_2$-Gehaltes, welcher zur Anpassung des Glutathionmetabolismus führen kann.

Die Untersuchung des Gesamtglutathions (Total GSH) in dieser Arbeit zeigte keinen eindeutigen Einfluss des Selens. Zwar ist der Gehalt in den Selenmangelgruppen tendenziell niedriger als in den selenversorgten Gruppen, jedoch ließ sich dies nicht gegenüber allen selenversorgten Gruppen statistisch absichern. Die tendenziell erhöhten Gehalte der höchsten Versorgungsgruppen mit einer Selenzulage von 2,0 mg Se/kg Diät unterschieden sich ebenfalls nicht signifkant von den anderen Versorgungsniveaus. Der massive Rückgang der cGPx jedoch zeigte sich deutlich

bei der Ermittlung der Gehalte an oxidiertem Glutathion. Denn lediglich in den Gruppen 0, die eine Selenmangeldiät erhielten und hiermit einhergehend einen Abfall der cGPx-Aktivität auf durchschnittlich 1,3% im Vergleich zu den selenversorgten Gruppen zeigten, konnte eine signifikante Abnahme an oxidiertem Glutathion (GSSG) und somit ein niedrigeres GSSG/GSH-Verhältnis beobachtet werden.
Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Glutathionparametern zeigte die Aktivität der Glutathionreduktase (GR) in den Versuchen 1 und 2 kein eindeutiges Ergebnis. Denn bei einem vergleichbaren GSSG/GSH-Verhältnis stieg die Enzymaktivität im Selenmangel gegenüber den selenversorgten Versuchsgruppen in Versuch 1 signifikant an, während Veränderungen in der Enzymaktivität in Versuch 2 gegenüber den selenversorgten Gruppen nicht statistisch abgesichert werden konnten.

In der Vergangenheit zeigten die Ergebnisse anderer Untersuchungen, dass einer Verschiebung des GSSG/GSH-Quotienten, wie sie ein Selenmangel oder eine Selentoxizität auslöst, durch eine gesteigerte GSH-Synthese und/oder erhöhte GR-Aktivität im Körper entgegengewirkt werden kann.
BURK et al. (1978) untersuchten die GPx-Aktivität in der Leber von Ratten, die eine Selenmangeldiät oder eine Diät mit 0,1 mg Se/kg als Natriumselenit über einen Zeitraum von drei Monaten erhielten. Es konnte kein Einfluss der Diäten auf die Aktivität der GR oder auf den Gehalt des Gesamtglutathions beobachtet werden. Allerdings wurde in diesem Versuch eine erhöhte Abgabe von Glutathion aus den perfundierten Lebern ermittelt.
Bei der Inkubation menschlicher Hep G2-Zellen in einem selenarmen oder selensupplementierten Medium konnte ebenfalls keine signifikante Veränderung des Gesamtglutathionsgehaltes oder der GR-Aktivität beobachtet werden (HELMY et al. 2000).
Neben einer erhöhten Abgabe von Glutathion aus der Leber in das Blut während eines 14-wöchigen Versuchs zur Untersuchung eines Selen- oder Vitamin E-Mangels auf den Glutathionmetabolismus in Rattenhepatozyten wurde eine erhöhte Aktivität der $\gamma$-Glutamylcysteinsynthetase ermittelt. Dieses Enzym wird durch „feed-back inhibition“ von der GSH-Konzentration der Zelle gesteuert und ist maßgeblich an der Synthese von Glutathion beteiligt (HILL und BURK 1982).
Selenmangel kann zu einer Verdoppelung der Plasmaglutathiongehalte führen (HILL und BURK 1985). Die Untersuchung des Glutathionmetabolismus in Lunge und Herz

selenmangelversorgter Ratten zeigte ebenfalls eine unveränderte Glutathionkonzentration und GR-Aktivität im Vergleich zu adäquat versorgten Tieren (XIA et al. 1985, JENKINSON et al. 1987). Den Anstieg der GSSG-Konzentration führten JENKINSON et al. (1987) auf eine gesteigerte cGPx-Aktivität bei selenversorgten Ratten zurück. Diese Hypothese scheint mit den hier vorliegenden Ergebnissen übereinzustimmen.
Eine Anpassung des Glutathionmetabolismus kann auch bei der Verabreichung toxischer Selengaben beobachtet werden. So zeigten LeBOEUF et al. (1983, 1985), dass ab einer Selenzulage von 6,0 mg Se/kg Diät in Form von Natriumselenit eine prooxidative Verschiebung des GSSG/GSH-Verhältnisses, die mit einer erhöhten Aktivität von GR und Glukose-6-Phosphatdehydrogenase einherging, zu beobachten ist. Dies ist auf die Funktion von GSH und GR bei der Reduktion von Selen zurückzuführen.

Die in der vorliegenden Arbeit unveränderte Glutathionkonzentration und Verschiebung des GSSG/GSH-Verhältnisses steht in Einklang mit vorangegangenen Untersuchungen. Allerdings deuten die Microarraydaten, welche sowohl die Expression der $\gamma$-Glutamylcysteinsynthetase als auch die Expression der $\gamma$-Glutamyltranspeptidase umfassten, nicht darauf hin, dass eine gerichtete Veränderung der Genexpression dieser Enzyme des Glutathionmetabolismus unter dem Einfluss der geprüften Selenvarianten erfolgte.
HILL und BURK (1982) postulieren eine erhöhte Synthese von Glutathion in der Zelle, um eine oxidative Verschiebung des GSSG/GSH-Verhältnisses zu unterbinden und den Verlust über die Zellmembran auszugleichen.
Die Ermittlung des Glutathiongehaltes im Plasma der Versuchsgruppen sowie eine Untersuchung der Aktivität von weiteren Enzymen des Glutathionmetabolismus könnte Aufschluss über den Einfluss des Selenmangels auf den Glutathionmetabolismus geben.
Eine Regulation der GR durch oxidativen Stress konnte im Schriftum mehrfach belegt werden (MULLINEAUX und CREISSEN 1997). Die unterschiedliche GR-Aktivität im Selenmangel in den Versuchen 1 und 2 zeigt jedoch, dass sie als Parameter für den Selenstatus kaum geeignet ist. Die veränderte Aktivität bei gleichbleibendem GSSG/GSH-Verhältnis könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Synthese von GSH der Kapazität der GR deutlich überlegen ist.

In der vorliegenden Arbeit führte die Selenzulage in Form von Natriumselenit und Natriumselenat bis zu 2,0 mg Se/kg Diät nicht zu gerichteten Effekten bezüglich des Glutathionmetabolismus. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei einer Zulage von 2,0 mg Se/kg Diät um eine supranutritive Selenzulage handelt, die noch nicht zu toxizitätbedingten Veränderungen des Glutathionmetabolismus führte.

*Glutathion-S-Transferasen*

In einer Reihe von Studien konnte im Selenmangel die Zunahme einer selen-unabhängigen GPx-Aktivität beobachtet werden (STONE und DRATZ 1980, MASUKAWA et al. 1984, MEHLERT und DIPLOCK 1985). Bereits Ende der 70er Jahre lieferten zwei Arbeitsgruppen den Nachweis, dass diese Entgiftungsprozesse auf die so genannten Glutathion-S-Transferasen (GSTs) zurückzuführen sind (LAWRENCE et al. 1977, PROHASKA und GANTHER 1977). GSTs katalysieren die Bildung von Thioethern aus Glutathion und einer Vielzahl reaktiver Verbindungen (z.B. Epoxide, organische Hydroperoxide und Alkenale).

HABIG und JAKOBY (1981) entwickelten eine Methode, die mit 1-Chloro-2,4-dinitro-benzol (CDNB) als Substrat für den Nachweis von GSTs arbeitet. Da alle GSTs mit CDNB reagieren, ist diese chemische Verbindung ein geeignetes Substrat, um die zelluläre Bandbreite der GST-Aktivität zu ermitteln. Innerhalb der Glutathion-S-Transferasen kommt den $\alpha$GSTs die entscheidende Rolle im Schutz der Zelle vor Lipidperoxidation zu, denn die Peroxidaseaktivität stammt in erster Linie aus dieser GST-Klasse. Neben einer allgemeinen Bestimmung der GSTs mit CDNB ist es zusätzlich möglich, unterschiedliche Substrataktivitäten zu nutzen, um eine ausgewählte GST-Klasse zu selektieren. RICCI et al. (1994) untersuchten 7-Dichlor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl) als Substrat der GSTs und konnten beobachten, dass einzig die $\alpha$GSTs eine hohe spezifische Aktivität gegenüber dieser Verbindung aufweisen.

In dieser Arbeit wurde die Aktivität der GSTs in beiden Versuchsdurchläufen mit Hilfe des allgemeinen „Screenings“ anhand der von HABIG und JAKOBY (1981) entwickelten Methode untersucht. In Versuch 1 reagierte die Aktivität der GSTs in der Leber nicht auf einen Selenmangel oder unterschiedliche Selenzulagen. In Versuch 2 wurde zusätzlich die Aktivität der $\alpha$GST durch Verwendung von NBD-Cl bestimmt. Hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Enzymaktivität in der Selenmangel-

gruppe gegenüber den adäquat versorgten Selenzulagegruppen (Abb. 15). Die Zulage von supranutritiven Selendosierungen (1,0 und 2,0 mg Se/kg Diät) führte bei beiden anorganischen Selenverbindungen tendenziell zu einem erneuten Anstieg der αGST-Aktivität.

Dies steht in Einklang mit Ergebnissen von CHRISTENSEN et al. (1994). Sie untersuchten die Regulation der αGST-Enzymaktivität durch Selen. Dabei führten ein Selenmangel sowie supranutritive Selenzulagen (2,0 mg Se/kg Diät) in Form von Natriumselenit zu einem signifikanten Anstieg der αGST-Aktivität.

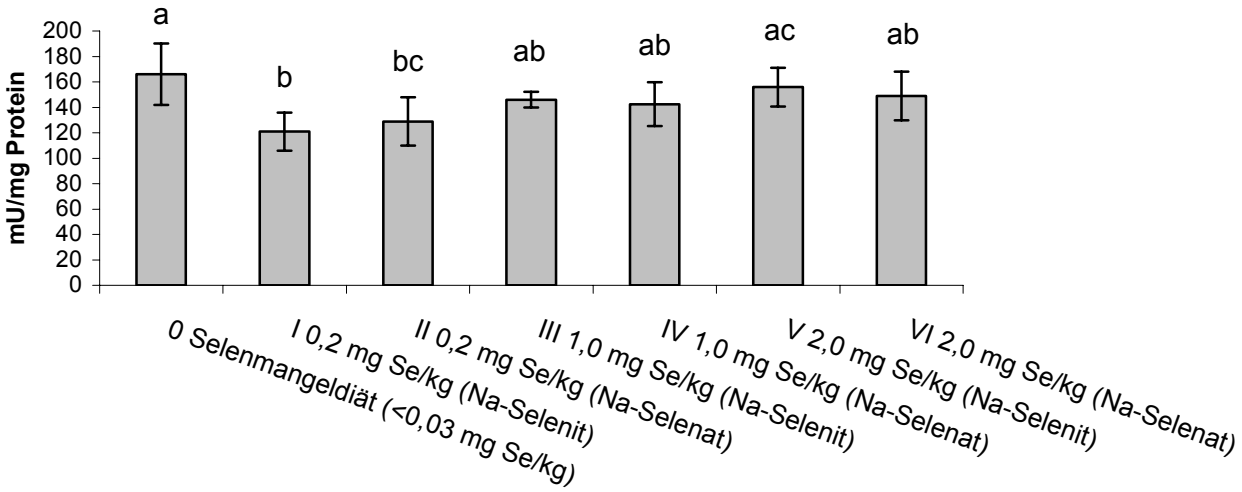



***Abbildung 15:*** *Einfluss unterschiedlicher Selenversorgung auf die Aktivität der αGST (Versuch 2) in der Rattenleber nach 8-wöchiger Versuchsdauer*

Die Ergebnisse des Microarrays zeigten eine Abnahme der Expression für die αGST A2 [identisch mit GST $Y_a$ subunit und GST alpha type ($Y_c$?)] um den Faktor 2,4 in den selenversorgten Gruppen. Dieses Ergebnis wurde mittels PCR verifiziert (Abb. 16).

In Versuch 2 können die Änderungen der Genexpression mit der Veränderung der Enzymaktivität in Einklang gebracht werden, obwohl dieser Effekt sich nicht auf Höhe des Microarrays befindet und als tendenziell zu bezeichnen ist. In Versuch 1, welcher in direkter Beziehung zum Microarray steht, konnten keine gerichteten Effekte beobachtet werden. Dies ist möglicherweise bereits auf Gewebeveränderungen durch die lange Lagerungsdauer vor der Isolation der mRNA für die Bestimmung der αGST A2 zurückzuführen. Im Verlauf der Untersuchungen wurde mehrfach

nachpräpariert. Eine Verifikation der Microarraydaten war daher nicht mehr vollständig möglich.

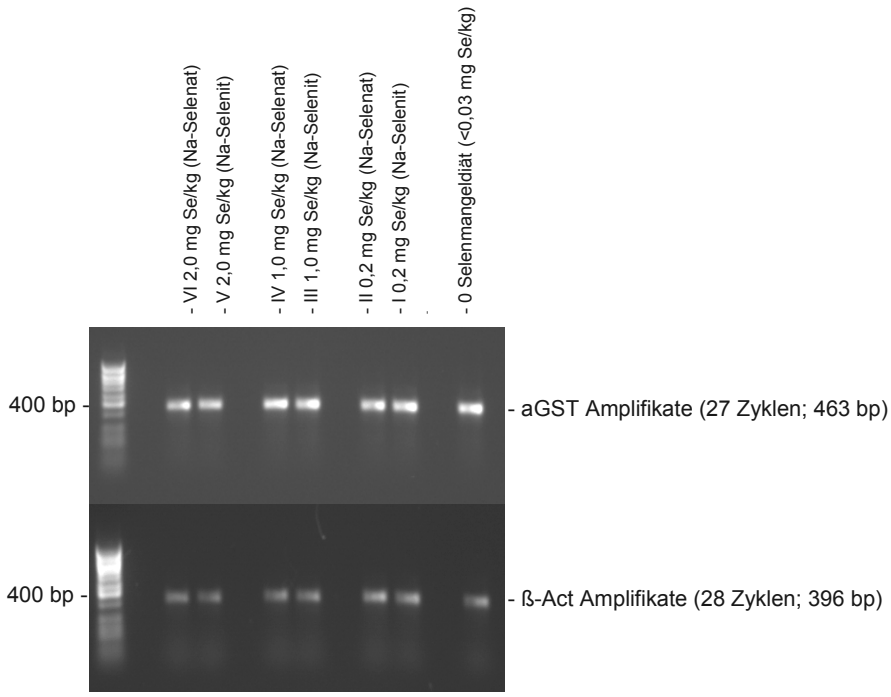



***Abbildung 16:*** *Einfluss unterschiedlicher Selenversorgung auf die Genexpression der αGST A2 (Versuch 2) in der Rattenleber nach 8-wöchiger Versuchsdauer*

McLEOD et al. (1997) konnten ebenfalls bei Fischer 344- und Hooded Lister-Ratten, die eine Selenmangeldiät erhielten, einen Anstieg der GST-Aktivität beobachten. Eine Western Blot-Untersuchung und anschließende Reversed-Phase HPLC konnten eine erhöhte Proteinexpression der αGST A5 und A2 aufdecken. Des Weiteren war die Genexpression der αGST A5 im Selenmangel erheblich heraufreguliert. Diese im Selenmangel deutlich erhöhte Expression von αGST A5, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Hier reagierten zwar sowohl die Isoenzyme A2 und A5 auf einen Selenmangel, jedoch fiel die Reaktion bei αGST A2 weitaus stärker aus.

In einer Studie von CHANG et al. (1990) konnten ebenfalls bei einer nahezu verdoppelten GST-Aktivität im Selenmangel gleichzeitig erhöhte mRNA-Gehalte für GST $Y_a$ und $Y_c$ Untereinheiten in der Rattenleber beobachtet werden.

Bei CHRISTENSEN et al. (1994) führten jedoch wachsende Selenzulagen (0-2,0 mg Se/kg Diät) zu einem Anstieg der mRNA-Gehalte für die αGSTs mit der Untereinheit

$Y_a$ in der Leber. Die αGSTs mit der Untereinheit $Y_c$ wiederum reagierten bei CHRISTENSEN et al. (1994) nicht einheitlich auf die Selenversorgung.

Die Veränderung der αGST-Aktivität in Gruppe 0 oder den supranutritiv versorgten Gruppen III bis VI unterliegt vermutlich verschiedenen Mechanismen. Im Selenmangel könnte der Anstieg der GST-Aktivität eine kompensatorische Reaktion des Organismus auf einen Abfall der GPx-Aktivität darstellen. Es ist anzunehmen, dass eine erhöhte Konzentration von reduziertem GSH - durch den Abfall der GPx - der GST-Konjugation zur Verfügung stehen könnte. Eine supranutritive Selenaufnahme würde daher nicht zu einem erneuten Anstieg der GST-Aktivität führen, wie es in den Gruppen III bis VI der Fall ist, d.h. neben dem Mechanismus einer Kompensation im Selenmangel könnte eine erhöhte Bildung von Selenmetaboliten bei supranutritiv versorgten Tieren einen zweiten Mechanismus auslösen.
Die Verabreichung von organischen Selenverbindungen, die im Körper einer so genannten Bioaktivierung zu Selenolen (RSeH) oder Seleninaten (RSeOH) im Selenstoffwechsel unterliegen, wirken positiv auf die Inhibition der Tumorbildung (IP et al. 2000). Die Wirkung von Selenocystein-Se-Konjugaten (RSeH; RSeOH) konnte in einer Studie von t´HOEN et al. (2002) mit der Induktion der Genexpression von αGST, darunter auch αGST A2, in Verbindung gebracht werden. Die Verabreichung von 1,1 mg Se/kg Diät in Form von Natriumselenit und zusätzlich von organischen Selenverbindungen führte bei EL-SAYED et al. (2006) ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der αGST-Expression und -Aktivität. Die Fütterung von anorganischen Selenverbindungen in supranutritiver Dosierung führte mit hoher Wahrscheinlichkeit in der vorliegenden Arbeit ebenfalls zu einem Anstieg von Se-Metaboliten im Organismus und dürfte so den beobachtbaren Anstieg der Genexpression und Aktivität bei einer supranutritiven Versorgungslage erklären.

## 5.5 Zellschädigungsparameter (Lipide und Proteine)

*Lipidperoxidation*

Ein Mangel an Selen und Vitamin E führt zu schweren Zellschäden. Der synergistische Effekt von Selen, Vitamin E und schwefelhaltigen Aminosäuren wurde bereits 1957 von SCHWARZ und FOLTZ beschrieben. Das als Faktor 3 beschriebene Selen konnte Lebernekrosen bei Ratten verhindern. Bei landwirtschaftlichen Nutztieren äußert sich ein klinisch manifester Selenmangel in Form ver-

schiedener Selenmangelkrankheiten. Zu den bekanntesten Erkrankungen zählen die nutritive Muskeldystrophie, die Maulbeerherzkrankheit und die exsudative Diathese (SCOTT 1987, ROSSOW und BOLDUAN 1994). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss eines Selenmangels und der Zulage von Selen in Form von Natriumselenit und Natriumselenat bis zu einer Stufe von 2,0 mg Se/kg Diät auf Lipidperoxidation (Abb. 17) und Proteinschädigungsparameter untersucht. Die Vitamin E-Zulage entsprach dabei den Mindestanforderungen nach NRC (1995).

Die Ermittlung der thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBA-RS) ist eine weitverbreitete Methode, um das Maß der Lipidperoxidation zu bestimmen (HALLIWELL und CHIRICO 1993). Die Vergleichbarkeit verschiedener Studien miteinander und mit den vorliegenden Daten gestaltet sich schwierig, da den Studien neben verschiedenen Versuchszeiträumen auch unterschiedliche Vitamin E-Zulagen zugrunde liegen.

So konnten MATSUDA et al. (1998) in einem 20-wöchigen Versuch mit Selenmangelratten und einer adäquat versorgten Versuchsgruppe (0,5 mg Se/kg Diät in Form von Natriumselenit) bei der Bestimmung der TBA-RS keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ermitteln. Die Vitamin E Zulage lag allerdings bei 50 mg/kg Diät.

Eine vergleichende Studie zwischen den futtermittelrechtlich zugelassenen anorganischen Selenverbindungen Natriumselenit und Natriumselenat bis zu einer Zulagehöhe von 2,0 mg Se/kg Diät über einen Zeitraum von 15 Wochen und Vitamin E-Zulagen von 100 I.E./kg Diät zeigte ebenfalls keine statistisch erfassbaren Unterschiede in der TBA-RS-Konzentration zwischen Selenmangel- und selenversorgten Gruppen (MOAK und CHRISTENSEN 2001).

LEE und CSALLANY (1994) wiederum untersuchten den Einfluss von Vitamin E und Selen auf die Lipidperoxidation in der Rattenleber und konnten einen stärkeren Anstieg der TBA-RS-Konzentration in den Versuchsgruppen beobachten, die eine Vitamin E-Mangeldiät erhielten. Die Tiere, welche eine Selenmangeldiät mit Vitamin E-Versorgung (30 mg Vitamin E/kg Diät) aufnahmen, hatten lediglich eine tendenziell erhöhte TBA-RS Konzentration im Vergleich zu der mit Selen und Vitamin E versorgten Versuchsgruppe.

Die TBA-RS in dieser Arbeit (Abb. 17) erreichten in der Selenmangelgruppe die höchsten Konzentrationen und nahmen signifikant bis zu einer supranutritiven Selenzulage von 2,0 mg Se/kg Diät ab. Die insbesondere im Selenmangel deutlich erhöhten Konzentrationen dürften auf die Kombination von Selenmangel und einer Vitamin E-Supplementierung, die nicht über die Empfehlungen hinausgeht, zurückzuführen sein.

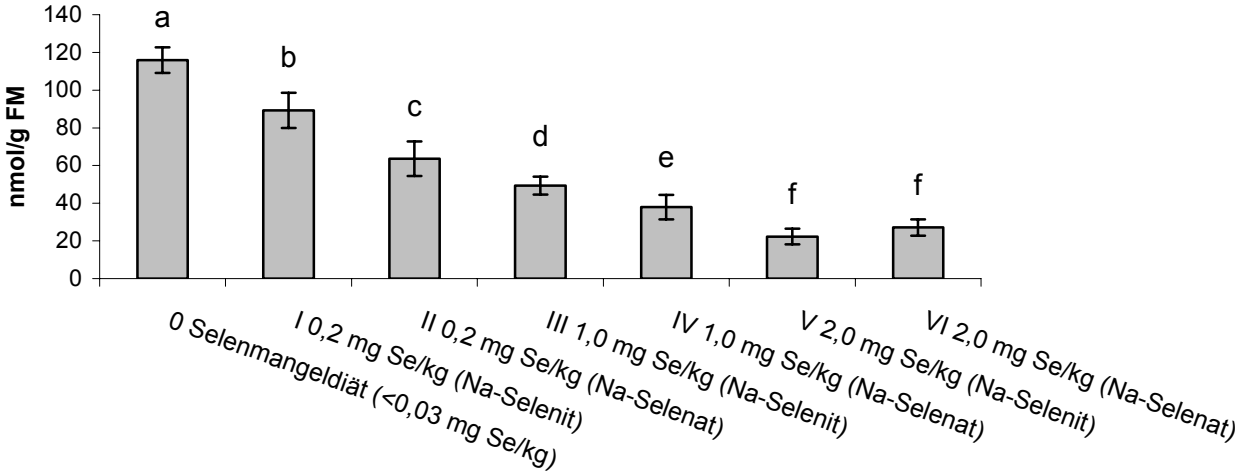



***Abbildung 17:*** *Einfluss unterschiedlicher Selenversorgung auf die TBA-RS-Konzentration (Versuch 1) in der Rattenleber nach 8-wöchiger Versuchsdauer*

Trotz der höheren Effektivität des Vitamin E beim Schutz der Zellen vor Lipidperoxidation, wie in den oben beschriebenen Studien gezeigt, konnten CHENG et al. (1999a, 1999b) durch die Induktion von akutem oxidativen Stress mit Hilfe von Paraquat an cGPx-Knockout-Mäusen und selendefizienten Tieren zeigen, dass der cGPx und anderen antioxidativ wirksamen Selenoenzymen bei der Abwehr der Lipidperoxidation eine wichtige Rolle zukommt. So konnten hohe Vitamin E-Gaben die cGPx nicht vollständig ersetzen. Die niedrigen Vitamin E-Gehalte der Diäten in der vorliegenden Arbeit sollten ausreichen, um schwere Symptome eines Doppelmangels zu vermeiden, jedoch niedrig genug sein, um die Folgen des Selenmangels anhand des Lipidschädigungsparameters TBA-RS deutlich herausstellen zu können.

Die in der vorliegenden Arbeit zu beobachtende weitere Reduktion der TBA-RS-Konzentration in den supranutritiven Selenzulagegruppen konnte von MOAK und CHRISTENSEN (2001), die ebenfalls eine adäquate (0,15 mg Se/kg Diät) und eine

supranutritive (2,0 mg Se/kg Diät) Selenzulagegruppe in ihrem Versuchsdesign vorsahen, nicht beobachtet werden. Es kann vermutet werden, dass die beim Schutz vor Lipidperoxidation deutlich höhere Effektivität des Vitamin E durch die Zulage von 100 I.E. Vitamin E/kg Diät die Effekte des Selens in der Studie von MOAK und CHRISTENSEN (2001) überdeckt hat.
Die Verwendung von Natriumselenat führte in der vorliegenden Arbeit überraschenderweise zu einer stärkeren Reduktion der TBA-RS als Natriumselenit. Dies konnte zwischen den Selenzulagegruppen I-IV (0,2-1,0 mg Se/kg Diät) signifikant abgesichert werden. MOAK und CHRISTENSEN (2001) konnten dieses Phänomen zwischen Natriumselenit und Natriumselenat in ihrer Studie allerdings nicht beobachten.

Die bei Verfütterung supranutritiver Selenzulagediäten erhöhte Konzentration von Selenmetaboliten im Gewebe konnte bereits mit einer erhöhten Expression und Aktivität von Isoenzymen der αGST-Familie in Verbindung gebracht werden (t´HOEN et al. 2002, EL-SAYED et al. 2006). Die biochemischen Mechanismen, die der Wirkung supranutritiver Selenzulagen zugrunde liegen, sind hingegen noch weitestgehend unklar. Ein Einfluss auf weitere Enzyme ist jedoch wahrscheinlich und könnte einen erhöhten Schutz vor Lipidperoxidation bieten.
Eine Untersuchung des Zusammenspiels zwischen Selen und Vitamin E durch gestaffelte Zulagen beider Nährstoffe und deren Einfluss auf die Lipidperoxidation könnte weiteren Aufschluss über Einzelwirksamkeit und kombinierte Wirksamkeit geben. Hierbei sollte auch die Wirkung verschiedener Selenverbindungen berücksichtigt werden. Da die Bestimmung der TBA-RS-Konzentration allerdings als ein relativ unspezifischer Parameter der Lipidperoxidation gilt, könnte außerdem die Verwendung spezifischer Parameter weiteren Aufschluss geben. Isoprostane als Abbauprodukte des nicht-enzymatischen Arachidonsäuremetabolismus gelten als spezifischer Parameter der Lipidperoxidation und werden zunehmend zur Beurteilung der Zellschädigung verwendet (MONTUSCHI et al. 2004).

*Proteinschädigung*

Die Reaktionsprodukte der Lipidperoxidation führen zur Schädigung weiterer Zellkomponenten. Dies ist auf deren Reaktionsfähigkeit mit Sulfhydryl- und Aminogruppen von Proteinen zurückzuführen (COMPORTI 1993, ESTERBAUER 1993).

Hierbei entstehen Zwischenprodukte, die sich als Carbonylverbindungen oder Nichtcarbonylverbindungen charakterisieren lassen. Die Bestimmung der Proteincarbonylkonzentration von Geweben ist ebenfalls ein nicht streng spezifischer Parameter, der jedoch für die Beurteilung der Proteinschädigung herangezogen werden kann.

In dieser Arbeit unterschied sich die Konzentration der Proteincarbonyle (PC) in der Leber nicht signifikant zwischen den Versuchsgruppen. Eine Gegenüberstellung der hier erfassten Daten mit anderen Arbeiten ist schwierig, da lediglich Studien veröffentlicht wurden, die nicht einen alleinigen Selenmangel oder eine Selentoxizität beschrieben, sondern in denen akuter oxidativer Stress durch die zusätzliche Gabe der Herbizide Paraquat oder Diquat an den Wildtyp oder cGPx-Knockout-Mäuse ausgelöst wurde.
Die Untersuchung der Proteincarbonylkonzentration bei cGPx-Knockout Mäusen bzw. selendefizienten Tieren zeigte jedoch, dass die Selenoenzyme, insbesondere die cGPx, einen Schutz vor akutem oxidativen Stress bieten (CHENG et al. 1999a, FU et al. 1999). Unter physiologischen Bedingungen kann der cGPx allerdings nur eine begrenzte physiologische Rolle als Antioxidanz zugesprochen werden, denn cGPx-Knockout-Mäuse weisen keine erhöhten Parameter einer Lipid- oder Proteinoxidation auf (HO et al. 1997).

Des Weiteren wurde die Aktivität der γ-Glutaminsynthetase (γGS) untersucht. Dieses Enzym katalysiert im Organismus die ATP-abhängige Reaktion von Ammoniak mit L-Glutamat zu L-Glutamin und dient somit der Ammoniakentgiftung in Gehirn, Leber, Niere und anderen Organen. Die Anzahl von 16 Histidinresten je Untereinheit macht dieses Enzym besonders anfällig für oxidative Modifikationen (LEVINE 1983), die zu einem Funktionsverlust des Enzyms führen. Daher dient die γGS als spezifischer Parameter der Proteinoxidation.
In der vorliegenden Untersuchung konnte kein signifikanter Abfall der γGS-Aktivität im Selenmangel beobachtet werden. In den selenversorgten Gruppen weist lediglich die Gruppe V mit einer Selenzulage von 1,0 mg Se/kg Diät in Form von Natriumselenit eine signifkant niedrigere Aktivität auf als die anderen Versuchsgruppen. Ein Vergleich mit Daten aus der Literatur ist auch für die γGS kompliziert, da dieses Enzym bisher lediglich in *in vitro*-Systemen oder ohne Bezug zum Selenstoffwechsel

untersucht wurde (NAKAMURA und STADTMAN 1984, NAKAMURA et al. 1985, STARKE-REED und OLIVER 1988).

Eine abschließende Betrachtung dieser beiden Proteinschädigungsparameter zeigt, dass die Aufnahme der verschiedenen Versuchsdiäten in den Lebern der Ratten nicht zu einer erhöhten Proteinmodifikation auf Grund von erhöhtem oxidativem Stress führte. Möglicherweise reichte eine Versuchsdauer von 8 Wochen bei ausreichender Vitamin E-Supplementation noch nicht aus, um neben veränderten TBA-RS Gehalten bereits nachweisbare Proteinschäden auszulösen.

## 5.6 Differenzielle Genexpression

Die Wirkung von Natriumselenat und/oder Vitamin E auf die differenzielle Genexpression wurde bereits von FISCHER et al. (2002) untersucht. In der vorliegenden Arbeit sollte der Effekt unterschiedlicher anorganischer Selenverbindungen auf die differenzielle Genexpression überprüft werden, da zu vermuten ist, dass die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften von Natriumselenat und Natriumselenit zu einer Variation der Genexpression führen.

Für die Absorption dieser beiden Verbindungen aus dem Darm in die Enterozyten konnte gezeigt werden, dass Selenit als die reaktivere Form des Selens bereits im Darm oder in den Enterozyten mit Thiolen reagiert und so die Blutbahn nicht als Selenit erreicht (ANUNDI et al. 1984; WOLFFRAM et al. 1986, MYKKANEN und WASSERMAN 1989). Selenat hingegen wird aktiv absorbiert und liegt in den Enterozyten als Selenat-Anion vor (WOLFFRAM et al. 1985, 1986, 1988). SUZUKI et al. konnten erstmals 2006 mit Hilfe radioaktiv markierter Selenverbindungen nachweisen, dass Selenat im Gegensatz zu Selenit bei oraler Verabreichung teilweise intakt in periphere Gewebe gelangt.

Im Organismus selbst werden alle Selenverbindungen bis zu der Oxidationsstufe des Selenids (-II) reduziert. So bildet sich auch bei der Verstoffwechselung von Selenat (+VI) das reaktivere Selenit (+IV) als Zwischenstufe (GANTHER 1971), das dann mit zahlreichen Verbindungen des Organismus in Wechselwirkung tritt und reagieren kann.

Neben der von der Art der Selenverbindung ausgehenden Wirkung auf die differenzielle Genexpression sollte auch die Wirkung unterschiedlich hoher Selenzulagen untersucht werden. Bei einer Selenversorgung über den Bedarf hinaus entstehen als

Abbauprodukte verschiedene Selenmetaboliten, die mit einer veränderten allgemeinen Genexpression in Verbindung stehen könnten.
Die Auswertung der Microarraydaten in dieser Arbeit zeigte einen Einfluss der verabreichten Selenverbindung auf die differenzielle Genexpression, während die Zulagehöhe im Bereich von 0,2 und 1,0 mg Se/kg Diät unter den gewählten Auswertungsbedingungen (Faktor ≥ 2,5; $p < 0,05$) zu keinen signifikanten Unterschieden führte.

Im folgenden Abschnitt soll auf die Wirkung von Selenat und Selenit auf die Expression von Genen aus ausgewählten Funktionsbereichen - unabhängig von der Höhe der Selenzulage - eingegangen werden.

*Zelluläre Detoxifikation/Xenobioticametabolismus*
Die als Referenz-Gen fungierende cGPx bestätigte das Vorliegen eines Selenmangels durch einen Anstieg um den Faktor 6 in allen selenversorgten Gruppen. Ein unterschiedlicher Einfluss der beiden geprüften Selenverbindungen auf die Genexpression war jedoch nicht erkennbar (siehe 5.3).
Wie erwartet führte die Heraufregulation der cGPx in den selenversorgten Versuchsgruppen zu einer Herabregulation von Genen der zellulären Detoxifikation bzw. des Xenobioticametabolismus. Die bereits erwähnte αGST A2 (siehe 5.4), die als Peroxidase fungiert, wurde bei Abfall der cGPx-Aktivität heraufreguliert, ohne erkennbaren Einfluss durch die Art der verabreichten Selenverbindung.

*Aflatoxin B1 Aldehydreduktase*
Auch die Aktivität der Aflatoxin B1-Aldehydreduktase (Akr7a3) wurde im Selenmangel heraufreguliert. McLEOD et al. (1997) konnten bei Fischer 344- und Hooded Lister-Ratten, die eine Selenmangeldiät erhielten, ebenfalls einen Anstieg der Aktivität und Expression der Akr7a3 sowie verschiedener αGST-Isoenzyme beobachten. Das extrem toxische Mykotoxin Aflatoxin B1 wird in Zusammenhang mit der Entstehung von Krebs in der Leber gesehen. Die Verstoffwechselung dieses Toxins führt zur Bildung von Exo- und Endo-8,9-Epoxiden, die zu DNA-Schäden führen (IYER et al. 1994). Diese Epoxide können durch ausgesuchte αGST-Isoenzyme wie αGST A2 und A5 detoxifiziert werden. Hierbei kommt der αGST A5 jedoch die weit höhere katalytische Aktivität gegenüber Exo- und Endo-8,9-Epoxiden

zu. Diese wird um das Tausendfache höher eingeschätzt (HAYES et al. 1991; PULFORD und HAYES 1996).
Die deutlich erhöhte Expression von αGST A5, wie sie McLEOD et al. (1997) im Selenmangel beschrieben, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht uneingeschränkt bestätigt werden. Hier reagierten zwar sowohl die Isoenzyme A2 und A5 auf einen Selenmangel, jedoch fiel die Reaktion bei αGST A2 weitaus stärker aus.
Ein weiteres Abbauprodukt des toxischen Epoxides ist ein Dialdehyd, welcher bei einem physiologischen pH-Wert durch spontane Hydrolyse der Epoxide entsteht. Der Dialdehyd kann in einer so genannten „Schiff´sche Base Reaktion“ mit der Aminogruppe von Proteinen reagieren und so seine toxische Wirkung entfalten (NEAL und COLLEY 1979). Die Akr7a3 ist in der Lage, diesen Aldehyd zu einem Alkohol zu reduzieren und so zu detoxifizieren (JUDAH et al. 1993).

Die erhöhte Expression einiger αGST-Isoenzyme und von Akr7a3 im Selenmangel ist vermutlich auf ein verschobenes Redoxgleichgewicht und daraus resultierenden adaptiven Reaktionen zurückzuführen, welches indirekt zu einer gesteigerten Abwehr gegen Aflatoxin B1 führt. Selenmangel wird im Allgemeinen mit einem erhöhten Krebsrisiko in Verbindung gebracht. In diesem speziellen Fall würde ein Selenmangel jedoch nach bisheriger Kenntnis eine anticarcinogene Wirkung aufweisen.

*Zellzyklus/Krebs/Apoptose*

*ADAM3 und ADAMTS1*
Die ADAM (a disintegrin and metalloprotease)-Familie von Transmembranproteinen gehört zu den Zinkproteasen und weist multifunktionale Domänen auf. ADAMs werden mit der Kontrolle der Membranverschmelzung, Zytokin- und Wachstumsfaktorabgabe, Zellmigration sowie Muskelentwicklung, Befruchtung und Zellschicksal in Verbindung gebracht (SEALS und COURTNEIDGE 2006).
Die Metalloproteinasen ADAMTS (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs) stehen in enger Beziehung zu der ADAM-Familie. Im Gegensatz zu diesen handelt es sich jedoch hierbei nicht um Transmembranproteine, sondern um sezernierte Moleküle mit einem Thrombospondinmotiv, die an die extrazelluläre Matrix binden. ADAMTS stehen mit der Aktivierung von zahlreichen Molekülen an

der Zelloberfläche u.a. Wachstumsfaktoren und Adhäsionsrezeptoren in Zusammenhang (PORTER et al. 2005).
Das Microarray-Screening in dieser Arbeit zeigte eine Regulation von ADAM3 und ADAMTS1 nach Verfütterung von Natriumselenat. Hierbei konnte ein Anstieg von ADAM3 um den Faktor 3,0 und ein Abfall von ADAMTS1 um den Faktor 2,5 beobachtet werden.
ADAM3 wird zusammen mit ADAM1 und ADAM2 eine wichtige Rolle bei der Initiation der Befruchtung zugesprochen (EVANS 2002). Der Knockout von ADAM2 führt zu Sterilität bei männlichen Mäusen, da die Bindung der Spermien an die Zona pellucida sowie die Migration in den Eileiter gestört ist (CHO et al. 1998). Des Weiteren führt der Funktionsverlust von ADAM2 zu einem massiven Verlust von ADAM1 und ADAM3. ADAM1 und ADAM2 werden in der Spermatogenese vermutlich für den Transport spezifischer Spemienproteine wie ADAM3 an die Zelloberfläche benötigt (CHO et al. 1998, NISHIMURA et al. 2001). Die Spermien von ADAM3-Mangel-Mäusen weisen ebenfalls eine gestörte Bindungsfähigkeit an die Zona pellucida auf (NISHIMURA et al. 2004).
ADAMTS1 wurde 1997 zunächst von KUNO et al. als Gen beschrieben, dessen Expression mit zahlreichen entzündlichen Prozessen sowie mit der Entwicklung einer krebsinduzierten Kachexie in Zusammenhang steht. In Pankreaskrebs-Zelllinien ist ADAMTS1 mit der lokalen Invasion und Lymphknotenmetastasierung assoziiert (MASUI et al. 2001) und bei Osteoarthritis konnte ADAMTS1 als Aggrecanase *in vivo* eine Funktion beim Knorpelabbau zugewiesen werden (NAGASE und KASHIWAGI 2003). Studien an ADAMTS1 Knockout-Mäusen konnten zeigen, dass dieses Gen wichtig für normales Wachstum, Fruchtbarkeit, Organentwicklung und –funktion ist (SHINDO et al. 2000, MITTAZ et al. 2004, SHOZU et al. 2005). Eine Heraufregulation von ADAM3 und eine Herabregulation von ADAMTS1 durch Zulage von Natriumselenat könnte daher eine positive Wirkung auf die Fruchtbarkeit haben und der Entwicklung von entzündlichen Prozessen, Krebs sowie Krebsfolgeerkrankungen entgegenwirken.

*USP2*

Die kovalente Bindung von Ubiquitin an Proteine ist eine posttranslationale Modifikation, welche die Proteine für den Abbau durch Proteosome markiert. Neben spezifischen Aminosäuresequenzen kann auch die Schädigung durch Oxidation,

Mutation, fehlerhafte Proteinfaltung oder Lokalisation eine Aktivierung des Ubiquitinsystems auslösen. Im Organismus existieren ubiquitinierende und deubiquitinierende Enzyme (WILKENSON 2000). In dieser Arbeit konnte ein signifikanter Abfall der Usp2 (ubiquitin specific protease 2) durch die Gabe von Natriumselenat um den Faktor 2,8 gegenüber der Kontrollgruppe (Se 0) beobachtet werden. Natriumselenit hingegen führte nicht zu einer statistisch absicherbaren Veränderung der Genexpression. Es wird angenommen, dass Usp2 die Degradation zahlreicher Proteine verhindert, die das Wachstum von Tumoren forcieren, indem es die betreffenden Proteine deubiquitiniert. GRANER et al. (2004) untersuchten die Isopeptidase Usp2a in einer menschlichen Zelllinie. Usp2a interagiert mit der FAS (fatty acid synthase), welche in aggressiven menschlichen Tumoren häufig überexprimiert wird. Die Inaktivierung von Usp2a führt hier zu einer geringeren FAS-Proteinkonzentration und einer erhöhten Apoptoserate. Der signifikante Abfall der Usp2 durch die Verabreichung von Natriumselenat könnte daher der Krebprävention dienen.

*Jag2*

Jag2 ist ein Ligand des Notch-Signalweges. Bei diesem Signalweg handelt es sich um einen über die Evolution bewahrten Mechanismus, der im Tierreich der Kontrolle des Zellschicksals durch Zell-Zell Interaktionen dient. Die Aktivität von Notch ist ein Baustein der Zellentwicklung, denn die Notch-Aktivität beeinflusst Zelldifferenzierung, Zellwachstum und Apoptose (ARTAVANIS-TSAKANOS et al. 1999). So wird Jag2 als Ligand dieses Signalweges mit der Zellentwicklung u.a. des Gehirns und der Spermatogenese in Verbindung gebracht (HAYASHI et al. 2001, IRVIN et al. 2004). Des Weiteren konnte in malignen Plasmazellen und bei Eierstockkrebs ein Anstieg der Expression von Jag2 beobachtet werden (HOUDE et al. 2004, EUER et al. 2005). In der eigenen Arbeit konnte durch die Gabe von Natriumselenat bei Jag2 ein Anstieg der Expression um den Faktor 3,0 erreicht werden. Die Heraufregulation von Jag2 durch Natriumselenat erscheint nach den Beobachtungen an Krebszellen allerdings nicht wünschenswert. Eine Verabreichung von Natriumselenit beeinflusste Jag2 hingegen nicht.

*Bcl-2 Antagonist*

Das Bcl-2 Antagonist (Bak 1)-Gen kodiert ein Protein, das zu der Bcl-2-Familie gehört. Die Bcl-2-Familie umfasst Proteine, die sowohl eine antiapoptotische (Bcl-2) als auch eine proapoptotische (Bax, Bak) Wirkung haben.

Wasserstoffperoxid konnte in zahlreichen Studien mit der Induktion und Vermittlung von Apoptose in Verbindung gebracht werden. Dies ist vermutlich auf den direkten Zusammenhang zwischen Selen und der $H_2O_2$ entgiftenden cGPx zurückzuführen. FAUCHER et al. (2005) konnten in einer Zelllinie, die cGPx überexprimierte, die Veränderung des Verhältnisses des proapoptotischen Bax zu dem antiapoptotischen Bcl-2 im Vergleich untersuchen und eine antiapoptotische Verschiebung feststellen.

In cGPx-Knockout-Mäusen konnte bei der Induktion von oxidativem Stress durch Paraquat-Gaben eine Herabregulation des antiapoptotischen Bcl-2 und eine Heraufregulation proapoptotischer Gene wie Bax beobachtet werden (CHENG et al. 2003).

YOON et al. (2001) konnten zeigen, dass erhöhte $H_2O_2$-Konzentrationen in einem Zellkulturmedium den Anstieg proapoptotischer Signale induzierte. Eine physiologische Selenitkonzentration in dem Medium konnte das Zellwachstum steigern und Bcl-2 heraufregulieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch lediglich Bak 1 und zwar nur durch Gabe von Selenat heraufreguliert. Dies steht nicht in Einklang mit den beschriebenen Beobachtungen der Apoptoseregulation bei genetisch-veränderten Mäusen bzw. in Zellkulturmedien. Diesem Phänomen sollte daher nochmals nachgegangen werden. Weitere Versuchsreihen sollten die Wirkung anorganischer Selenverbindungen auf alle bekannten Mitglieder der Bcl-Familie umfassen. Da beide Selenverbindungen eine hohe Verfügbarkeit für die Synthese von Selenoproteinen aufweisen, könnten neben der Funktion der cGPx bei der Regulation der Apoptose möglicherweise die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der hier verwendeten anorganischen Selenverbindungen eine Rolle spielen.

*Odf2*

Die Familie der Odf (Outer dense fiber) Proteine, die aus Odf1, Odf2 (Cenexin2) und Odf3 besteht, ist Teil einer größeren Gruppe von Proteinen, die sich während der Spermatogenese am Axonem des Spermienschwanzstückes sammeln (KIERZENBAUM 2002). Diesen ODFs konnte bis heute kein aktiver Beitrag zur

Spermienmotilität zugeordnet werden. Vielmehr scheinen sie notwendig, um Elastizität und Bruchfestigkeit der Spermien zu gewährleisten (BALTZ et al. 1990). Es konnte außerdem eine Verbindung von ODF2 zu Zentrosomen und Mikrotubuli aufgedeckt werden (NAKAGAWA et al. 2001, HOYER-FENDER et al. 2003, DONKOR et al. 2004). Ein Anstieg der Genexpression von Odf2 um den Faktor 3,7 konnte in den mit Natriumselenat versorgten Versuchsgruppen beobachtet werden. Die Wirkung von Natriumselenit hingegen war wiederum nicht statistisch absicherbar. Die erhöhte Expression von Odf2 durch Natriumselenat könnte neben der direkten Wirkung von TrxR (SU et al. 2005) und PHGPx (URSINI et al. 1999) auf die Spermienqualität eine indirekte Wirkung des Selens darstellen.

*Ddx1*

Das DEAD box Protein Ddx1 (DEAD box polypeptide 1) ist vermutlich eine RNA-Helikase, die mit der RNA-Bearbeitung und dem RNA-Transport in Verbindung gebracht wird (BLEOO et al. 2001, KANAI et al. 2004). Eine gesteigerte Genexpression konnte in Zusammenhang mit Retinoblastomen und Neuroblastomen sowie HIV-Replikation ermittelt werden (GODBOUT et al. 1998, KRISHNAN und ZEICHNER 2004). Auch hier bewirkte nur Selenat einen Anstieg der Genexpression. Der Faktor lag bei 4,9. Die Auswahl von Natriumselenat oder Natriumselenit für die Supplementierung könnte daher durch deren Wirkung auf die Expression von Ddx1 die Tumorbildung bzw. HIV-Replikation unterschiedlich beeinflussen.

*Plk2*

Die Plk (polo-like kinases) sind eine multifunktionale Enzymfamilie, die an der Regulation des Zellzyklus und der stressinduzierten Zellantwort durch DNA-Schäden beteiligt sind. Im Säugerorganismus konnten bis heute vier Mitglieder dieser Familie (Plk1-4) identifiziert werden (VAN DE WEERDT UND MEDEMA 2006). Die Microarrayuntersuchung in dieser Arbeit zeigte für die Plk2 eine um den Faktor 6,7 erhöhte Genexpression in den mit Natriumselenat versorgten Versuchsgruppen im Vergleich zu Se 0. Die Plk2 ist entscheidend für die embryonale Entwicklung (MA et al. 2003). Des Weiteren kommt Plk2 möglicherweise eine tumorsuppressive Wirkung zu (SMITH et al. 2006). Die Verabreichung von Natriumselenit zeigt diese nach heutigem Wissensstand wünschenswerte Wirkung jedoch nicht.

*Chk2*

Die CHK (Checkpoint kinases) sind Bestandteil des „DNA damage response pathways“. Chk2 konnte hierbei als Regulator von p53, einem apoptose-regulierenden Transkriptionsfaktor, ermittelt werden. Als Zwischenstufe dieses Reaktionsweges wird eine herabgesetzte Expression von Chk2 mit der Entwicklung von Brustkrebs und Prostatakrebs bei Männern assoziiert (ZHOU und ELLEDGE 2000, WEISS et al. 2005, DONG 2006). Auch Chk2 wurde hier lediglich durch die Gabe von Selenat und nicht durch Selenit um den Faktor 2,9 heraufreguliert. Die Verabreichung von supranutritiven Selengaben konnten CLARK et al. (1998) mit einem verringerten Prostatakrebsrisiko in Verbindung bringen. Die Regulation von Chk2 könnte hierbei eine wichtige Rolle spielen.

*HSP20*

HSP20 (heat shock protein 20, alphab crystallin-related protein) gehört zu der Familie der “small heat shock proteins”. Bis heute konnte die Interaktion von HSP20 mit verschiedenen biologischen Prozessen in Verbindung gebracht werden. Hierzu gehören die Kontraktionsfähigkeit der Herzmuskulatur, Regulation der Aktivität vasomuskulärer Entspannung, Glucose-Transport, Inhibition der Aggregation der Blutplättchen sowie der Schutz vor Apoptose und Verletzungen durch Ischämie und Reperfusion (FAN et al. 2005). Auch dieses „heat shock protein“ wurde nur durch die Gabe von Natriumselenat, nicht aber durch die Gabe von Natriumselenit im Vergleich zu Se0 um den Faktor 5,0 heraufreguliert. Die Supplementierung von Natriumselenat dürfte so über die Expression von HSP 20 oben genannte Prozesse im Organismus beeinflussen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der anorganischen Selenverbindungen Natriumselenit und Natriumselenat die Wirkung auf die Genexpression erheblich beeinflussen. Bereits bei Betrachtung dieser kleinen Auswahl zweier Funktionsgruppen zeigte Selenat bei der differenziellen Genexpression von Zellzyklus-, Apoptose- und Proteinabbauproteinen eine deutlich stärkere Wirkung als Selenit. Diese kann jedoch in Abhängigkeit vom exprimierten Gen sowohl positive als auch negative Auswirkungen haben, wenngleich die positiven Effekte zu überwiegen scheinen.

Werden alle Funktionsgruppen, die bei der Auswertung unter den genannten mathematischen Voraussetzungen signifikante Unterschiede zeigten gegenübergestellt, so wurden durch Natriumselenat insgesamt 109 Gene beeinflusst, während dies bei Natriumselenit lediglich 6 Gene waren.

# 6 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass Natriumselenat der Selenverbindung Natriumselenit bei der Beeinflussung der Genexpression deutlich überlegen ist. Dies ist vermutlich auf chemische Unterschiede und damit einhergehend unterschiedliche Absorptionsmechanismen und Stoffwechselvorgänge zurückzuführen. Eine detaillierte Untersuchung des Stoffwechsels dieser Selenverbindungen nach der Absorption mittels radioaktiv markierten Selens könnte helfen, den Metabolismus dieser zwei Selenverbindungen und die daraus resultierenden Unterschiede zu klären.

Außerdem konnte der Microarray zeigen, dass Natriumselenat die Expression von zahlreichen Genen des Zellzyklus, die mit Krebserkrankungen in Verbindung stehen, beeinflusst. Dies ist bereits bei dem nutritiven Bedarf adäquaten Dosierungen zu beobachten. Supranutritive Dosierungen führten dabei zu keinen weitergehenden Effekten. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die schon früher bei einzelnen Selenverbindungen beobachtete anticarcinogene Wirkung. In weiteren Versuchsreihen sollte diesem Phänomen nachgegangen werden, um sowohl die anti- als auch die möglicherweise procarcinogene Wirkung von Selen genauer aufzuklären. Zusätzlich könnte eine Clusteranalyse der Microarraydaten helfen, spezifische Muster in der Genexpression aufzudecken.

Bezüglich der Expression und Aktivität von Selenoenzymen zeigte sich zwischen Natriumselenit und Natriumselenat bis zu einer Zulage von 2,0 mg Se/kg Diät keine unterschiedliche Wirksamkeit. Die Untersuchung verschiedener Selenoenzyme bestätigte deren in der Literatur beschriebene Hierarchie im Selenmangel.

Die Untersuchung zeigte weiter, dass anorganische Selenverbindungen in komplexer Art und Weise in das antioxidative Schutzsystems der Zelle eingreifen. Dies zeigt sich besonders an der $\alpha$GST-Aktivität und der TBA-RS-Konzentration. Neben einem Anstieg dieser Parameter im Selenmangel bewirkten supranutritive Selendiäten einen erneuten Anstieg der $\alpha$GST-Aktivität bei fortlaufender Abnahme der TBA-RS-Konzentration bis zu einer Selenzulage von 2,0 mg Se/kg Diät. Dies deutet darauf hin, dass bei supranutritiver Dosierung selenoenzymunabhängige Zellschutzmechanismen induziert werden. Auf diese Weise wird oberhalb maximaler Selenoenzymaktivitäten eine indirekte Zellschutzwirkung auch durch anorganische Selenverbindungen erzeugt. Eine Untersuchung des Einflusses verschiedener

Selenzulagen auf αGSTs und weiterer Phase II-Enzyme sowie eine Erfassung der Lipidperoxidation durch sensiblere Parameter sollte daher in Betracht gezogen werden.

# 7 Zusammenfassung

Die anorganischen Verbindungen Natriumselenat und Natriumselenit sind als Zusatzstoffe in der Tierernährung zugelassen. In den überarbeiteten synthetischen Diäten des American Institute of Nutrition (AIN), die in den Fütterungsempfehlungen des National Research Council (NRC) für Labortiere niedergelegt sind, wurde Natriumselenit bereits 1993 durch Natriumselenat ersetzt. In aktuellen Studien kann daher zunehmend die Verwendung von Natriumselenat beobachtet werden. Grundlegende Untersuchungen zur Vergleichbarkeit von Versuchsreihen auf Basis von Natriumselenit mit Versuchen auf Basis von Natriumselenat liegen bisher kaum vor. Darüber hinaus sind die Schritte der Metabolisierung beider Selenverbindungen nach Aufnahme in die Enterozyten bislang nicht genau geklärt. Bisherige Untersuchungen lassen jedoch für die Metabolisierung Unterschiede vermuten. Eine unterschiedliche Metabolisierung beider Selenverbindungen könnte im Folgenden auch Auswirkungen auf die differenzielle Genexpression haben und sollte in dieser Arbeit ebenfalls untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher

1. Die Wirkung der anorganischen Selenverbindungen Natriumselenit und Natriumselenat in adäquater Dosierung sowie in zwei supranutritiven Dosierungen im Vergleich zu einer Selenmangelgruppe untersucht werden. Hierbei sollte die Wirkung von Natriumselenit der von Natriumselenat direkt gegenübergestellt werden.
2. Mit Hilfe eines Microarray-Screenings sollten die Auswirkung dieser anorganischen Selenverbindungen auf die differenzielle Genexpression allgemein erfasst und spezifische Parameter der Selenversorgung auf Ebene der Genexpression und der Proteine eingehend untersucht werden.
3. Diese Kenngrößen sollten durch die Bestimmung von Zellschädigungsparametern ergänzt werden.

Dazu wurden in zwei Versuchen insgesamt 112 wachsende männliche Albinoratten (Stamm HK51) über einen Zeitraum von acht Wochen mit Versuchsdiäten auf Basis von Torulahefe gefüttert, um einen alimentären Selenmangel zu erzeugen und

diesen mit einer adäquaten (0,2 mg Se/kg Diät) bzw. supranutritiven Selenversorgung (1,0 und 2,0 mg Se/kg Diät) zu vergleichen. Die Diäten wurden entweder mit Natriumselenit oder mit Natriumselenat supplementiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- In Übereinstimmung mit anderen Studien zeigten beide Selenverbindungen eine hohe Bioverfügbarkeit. Ein Selenmangel führte bei der cytosolischen Glutathionperoxidase (cGPx), der plasmatischen Glutathionperoxidase (pGPx), der Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase (PHGPx), der cytosolischen Thioredoxinreduktase (TrxR1) und der mitochondrialen Thioredoxinreduktase (TrxR2) zu einer signifikanten Abnahme der Enzymaktivität. Durch Zulage von 0,2 mg Se/kg Diät als Natriumselenit oder Natriumselenat konnte die Abnahme der Aktivität der Selenoenzyme vollständig verhindert werden.
- Das Verhalten der untersuchten Selenoenzyme in Bezug auf Genexpression und Aktivität im Bereich zwischen Selenmangel und empfohlener Supplementierung steht in Einklang mit der in der Literatur beschriebenen Hierarchie der Selenoenzyme: PHGPx > TrxR > cGPx = pGPx. Eine Selenversorgung, die die empfohlene Zulage von 0,2 mg Se/kg Diät überschritt, führte bei der Enzymaktivität sowie bei den mRNA-Gehalten zu keinen weiteren Verbesserungen.
- $\alpha$-Glutathion-S-Transferasen ($\alpha$GST) reagieren im Rahmen der Genexpression und Enzymaktivität auf Selenmangel und eine supranutritive Selensupplementierung. Im Selenmangel könnte der Anstieg der GST-Aktivität eine kompensatorische Reaktion des Organismus auf einen Abfall der GPx-Aktivität darstellen, während der Anstieg von Se-Metaboliten bei einer supranutritiven Selenversorgung die Induktion der Expression und der Aktivität von $\alpha$GSTs nach sich zieht.
- Im Selenmangel konnte erwartungsgemäß ein Anstieg von thiobarbitursäurereaktiven Substanzen (TBA-RS) als Parameter der Lipidperoxidation beobachtet werden. Die bei supranutritiver Selenzulage beobachtete fortgesetzte Abnahme der TBA-RS ist hingegen überraschend und deutet auf

Mechanismen hin, die über die maximale Expression und Aktivität von Selenoenzymen des Zellschutzes hinaus durch einen Anstieg von Se-Metaboliten aktiviert werden. Ein ähnliches Verhalten konnte bereits bei Isoenzymen der αGST-Familie beobachtet werden.

- Das Microarray-Screening ergab zwar keinen Einfluss der Höhe der Selenzulage auf die differenzielle Genexpression, konnte jedoch eindeutig einen Unterschied zwischen den beiden Selenverbindungen Natriumselenit und Natriumselenat belegen. Unter den gewählten Voraussetzungen einer mindestens 2,5-fachen Veränderung der Expression wurden durch Natriumselenat insgesamt 109 Gene beeinflusst, während bei Natriumselenit lediglich 6 Gene beeinflusst wurden. Insgesamt konnte bei der differenziellen Genexpression ein erheblich größerer Effekt für Natriumselenat als für Natriumselenit nachgewiesen werden.

Die Untersuchung verschiedener Selenoenzyme (pGPx, cGPx, PHGPx, TrxR1, TrxR2) bestätigte die hohe Bioverfügbarkeit beider Selenverbindungen für die Synthese von Selenoproteinen. Einflüsse der Selenzulage auf das antioxidative Schutzsystem wurden bei den αGSTs und der TBA-RS-Konzentration festgestellt. Eine detaillierte Untersuchung der αGSTs und weiterer Phase II-Enzyme könnte in künftigen Untersuchungen neben sensiblen Parametern für die Lipidperoxidation die Wirkung verschiedener Selenzulagen auf das antioxidative Schutzsystem weiter verdeutlichen. Zusätzlich könnte eine Clusteranalyse der Microarraydaten die Auswirkungen von Natriumselenat auf die Genexpression weiter aufklären und die Vor- bzw. Nachteile einer Supplementation mit Natriumselenat oder Natriumselenit hervorheben.

# 8 Summary

**Influence of nutritive and supranutritive dosages of sodium selenite and sodium selenate on the activity and gene expression of selenoenzymes and the antioxidative status of rats**

The inorganic chemical compounds sodium selenite and sodium selenate are approved food additives. In 1993 the American Institute of Nutrition (AIN) adapted its purified diets for rats and in the course of this revision replaced sodium selenite by sodium selenate. These diets are also recorded in the booklet “Nutrient Requirements of Laboratory Animals” by the National Research Council (NRC). Therefore the application of sodium selenate can be observed in an increasing number of recent animal experiments. But very few primary studies have been conducted to examine the comparability of sodium selenite and sodium selenate. Furthermore the exact metabolism of these selenium compounds after absorption into the enterocytes of the gastrointestinal tract is unclear. However, considering the results of previous studies it is most likely that differences in metabolism exist. These differences might have bearing on differential gene expression and will also be considered in this study.

The following study was conducted to investigate:

1. The effect of the inorganic selenium compounds sodium selenite and sodium selenate supplemented at a recommended level and at two different supranutritive levels in comparison to a selenium deficient group. In order to observe individual effects of the selenium compounds sodium selenite and sodium selenate are placed in direct contrast.
2. The overall bearing of sodium selenite and sodium selenate on differential gene expression analyzed via microarray screening. A close examination of specific parameters of selenium supplementation conducted on the level of gene expression and proteins.
3. These indicators are completed by analyzing parameters of cell damage.

In two animal experiments 112 growing male albino rats (HK 51) were fed a torula yeast-based diet for eight weeks. One experimental group was randomly assigned to

the selenium-deficient diet while two groups each were assigned to the adequately (0.2 mg Se/kg diet) or supranutritively (1.0 and 2.0 mg Se/kg diet) supplemented diets. Groups located on the same supplementary level received selenium either as sodium selenate or sodium selenite.

The following results were obtained:

- In accordance with other trials both selenium compounds had a high biological availability. Selenium deficiency induced a significant decline of the enzyme activity of cytosolic glutathione peroxidase (cGPx), plasmatic glutathione peroxidase (pGPx), phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx), cytosolic thioredoxin reductase (TrxR1), and mitochondrial thioredoxin reductase (Trxr2). The supplementation of 0.2 mg Se/kg diet was able to correct the decline of enzyme activity for all selenoenzymes named above.
- The comparison of the selenium-deficient groups and the adequately Se-supplemented groups (0.2 mg Se/kg diet) showed that the examined selenoenzymes react in a hierarchic manner: PHGPx > TrxR > cGPx = pGPx on the level of gene expression and enzyme activity. This order is in agreement with the hierarchy described in literature.
- $\alpha$-Glutathione-S-transferases ($\alpha$GSTs) react upon selenium deficiency and supranutritive selenium supplementation. An increase of enzyme activity during selenium deficiency could be a compensatory reaction of the organism towards a massive decrease of GPx-activity, while supranutritive selenium supplementation results in an increase of selenium metabolites and induces the expression and activity of $\alpha$GSTs thereby.
- As expected selenium deficiency led to an increase of lipid peroxidation as detected by the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS). Surprisingly TBA-RS showed an ongoing decline in the supranutritive Se-supplementation groups. This indicates that mechanisms beyond maximal gene expression and enzyme activity of selenoenzymes exist that are activated by an increase of selenium metabolites. For isoenzymes of the $\alpha$GST-family this type of reaction has already been observed.
- The microarray screening did not reveal an influence on differential gene expression by the selenium supplementation level, but it clearly proved a

difference between the selenium compounds sodium selenite and sodium selenate. Providing a minimum variation of 2.5 in gene expression sodium selenate affected a total of 109 genes while sodium selenite merely influenced 6 genes. All in all determination of differential gene expression demonstrated that sodium selenate had a considerably greater effect than sodium selenite.

Analysis of different selenoenzymes (pGPx, cGPx, PHGPx, TrxR1, TrxR2) confirmed the high biological availability of both selenium compounds for the synthesis of selenoproteins. An influence of selenium supplementation levels on the antioxidative defence system was assessed by αGSTs and TBA-RS concentration. A detailed investigation of αGSTs and other phase II-enzymes in addition to sensitive parameters of lipid peroxidation could clarify the effect of a varying selenium supplementation on the antioxidative defence system in future studies. In addition cluster analysis of the microarray data might help clarify the influence of sodium selenate on differential gene expression and demonstrate the pros and cons of a dietary supplementation with sodium selenite or sodium selenate.

# 9 Literaturverzeichnis

AFFORD, S.; RANDHAWA, S. (2000): Apoptosis. J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol. **53**: 55-63

ANONYMOUS (1983): Effects of Excess Selenium. In: Selenium in Nutrition: National Academy of Sciences. The National Academies Press, USA

ANUNDI, I.; HOEGBERG, J.; STAHL, A. (1984): Absorption of selenite in the rat small intestine: Interactions with glutathione. Acta. Pharmacol. Toxicol. **54**: 273-277

ARDÜSER, R.S.; WOLFFRAM, S.; SCHARRER, E. (1985): Active absorption of selenate by rat Ileum. J. Nutr. **115**:1203-1208

ARDÜSER, R.S.; WOLFFRAM, S.; SCHARRER, E.; SCHNEIDER, B. (1986): Transport of selenate and selenite across the brush border membrane of rat and sheep small intestine. Biol. Trace Elem. Res. **9**: 281-290

ARNÉR, E.S.J.; HOLMGREN, A. (2000): Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. Eur. J. Biochem. **267**: 6102-6109

ARTAVANIS-TSAKANOS, S.; RAND, M.D.; LAKE, R.J. (1999): Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. science **284**: 770-776

ARTHUR, J.R.; BECKETT, G.J. (1994): Symposium 2 newer aspects of micronutrients in at risk groups: New metabolic roles for selenium. Proceedings of the Nutrition Society **53**: 615-624

AWASTHI, Y.C.; SHARMA, R.; SINGHAL, S.S. (1994): Human glutathione S-transferase. Int. J. Biochem. **26**: 295-308

BAKER, D.C.; JAMES, L.F.; HARTLEY, W.J.; PANTER, K.E.; MAYNARD, H.F.; PFISTER, J. (1989): Toxicosis in pigs fed selenium-accumulating Astragalus plant species or sodium selenate. Am. J. Vet. Res. **50**: 1396-1399

BALTZ, J.M.; WILLIAMS, P.O.; CONE, R.A. (1990): Dense fibers protect mammalian sperm against damage. Biol. Reprod. **43**: 485-491

BARCELOUX, D.G. (1999): Selenium. Clinical Toxicology **37**: 145-172

BECK, M.A.; ESTWORTHY, R.S.; HO, Y.S.; CHU, F.F. (1998): Glutathione peroxidase protects mice from viral induced myocarditis. FASEB J. **12**: 1143-1149

BECK, M.A.; KOLBECK, P.C.; ROHR, L.H.; SHI, Q.; MORRIS, V.C.; LEVANDER, O.A. (1994): Amyocarditic coxsackievirus becomes myocarditic in selenium deficient mice. J. Med. Virol. **43**: 166-170

BECKETT, G.J.; ARTHUR, J.R. (2005): Selenium and the endocrine system. J Endocrinol. **184**: 455-465

BEHNE, D.; KYRIAKOPOULOS, A.; SCHEID, S.; GESSNER, H. (1991): Effect of chemical form and dosage on the incorporation of selenium in tissue proteins in rats. J. Nutr. **121**: 806-814

BEHNE, D.; KYRIAKOPOEULOS, A.; WEISS-NOWAK, C.; KALCKLOESCH, M.; WESTPHAL, C.; GESSNER, H. (1996): Newly found selenium-containing proteins in the tissues of the rat. Biol. Trace Elem. Res. **55**: 99-110

BEHNE, D.; WOLTERS, W. (1983): Distribution of selenium and glutathione peroxidase in the rat. J. Nutr. **113**: 456-461

BEILSTEIN, M.A.; WHANGER, P.D. (1986a): Deposition of dietary organic and inorganic selenium in rat erythrocyte proteins. J. Nutr. **116**: 1701-1710

BEILSTEIN, M.A.; WHANGER, P.D. (1986b): Chemical forms of selenium in rat tissues after administration of selenite or selenomethionine. J. Nutr. **116**: 1711-1719

BERGGREN, M.M.; MANGIN, J.F.; GASDASKA, J.R.; POWIS, G. (1999): Effect of selenium on rat thioredoxin reductase activity. Biochem. Pharmacol. **57**:187-193

BERLETT, B.S.; STADTMAN, E.R. (1997): Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J. Biol. Chem. **272**: 20313-20316

BERRY, M.J.; BANU, L.; CHEN, Y.; MANDEL, S.J.; KIEFFER, D.; HARNEY, J.W.; LARSON, P.R. (1991): Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3´untranslated region. Nature **353**: 273-276

BEYER, R.E. (1994): The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: Interaction with vitamin E and coenzyme Q. J. Bioenerg. Biomem. **26**: 349-358

BJÖRNSTEDT, M.; HAMBERG, M.; KUMAR, S.; XUE, J.; HOLMGREN, A. (1995a): Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenosols. J. Biol. Chem. **270**: 11761-11764

BJÖRNSTEDT, M.; KUMAR, S.; HOLMGREN, A. (1995b): Selenite and selenodiglutathione: Reaction with thioredoxin systems. Methods Enzymol. **252**: 209-219

BJÖRNSTEDT, M.; XUE, J.Y., HUANG, W.H.; AKESSON, B. and HOLMGREN, A. (1994): The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient donors to human plasma glutathione peroxidase. J. Biol. Chem. **269**: 29382-29384

BLEOO, S.; SUN, X.; HENDZEL, M.J.; ROWE, J.M.; PACKER, M.; GODBOUT, R. (2001): Association of human DEAD box protein DDX1 with a cleavage stimulation factor involved in 3´-end processing of pre-mRNA. Mol. Biol. Cell **12**: 3046-3059

BÖCK, A.; FORCHHAMMER, K.; HEIDER, J.; Leinfelder, W.; SAWERS, G.; VEPREK, B.; ZINONI, F. (1991): Selenocysteine: The 21st amino acid. Molec. Microbiol. **5**: 515-520

BRADFORD, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **7**:248-254

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. (1999): Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. Free Rad. Biol. Med. **27**: 951-965

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; AUMANN, K.-D.; BLÖCKNER, H.; GROSS, G.; KIESS, M.; KLÖPPEL, K.-D.; MAIORINO, M.; ROVERI, A.; SCHUNKELT, R.; URSINI, F.; WINGENDORF, E.; FLOHÉ, L. (1994): Phospolipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. J. Biol. Chem. **269**: 7342-7348

BRIGELIUS-FLOHÉ, R., FRIEDRICHS, B.; MAURER, S.; SCHULTZ, M.; STREICHER, R. (1997): Interleukin-1-induced nuclear factor κB activation is inhibited by overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in a human endothelial cell line. Biochem. J. **328**: 199-203

BRIVIBA, K.; KLOTZ, L.-O.; SIES, H. (1999): Defenses against peroxynitrite. Methods. Enzymol. **301**: 301-311

BROWN, T.L.; LE MAY, H.E. (1988): In: Chemie, Ein Lehrbuch für Naturwissenschaftler. VCH Chemie, Weinheim und New York

BUETTNER, G.R. (1993): The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α-tocopherol, and ascorbate. Arch. Biochem. Biophys. **300**: 535-543

BURK, R.F.; NISHIKI, K.; LAWRENCE, R.; CHANCE, B. (1978): Peroxide removal by selenium-dependent and selenium-independent glutathione peroxidases in hemoglobin-free perfused rat liver. J. Biol. Chem. **253**: 43-46

BURTON, G.W.; JOYCE, A.; INGOLD, K. (1983): Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes. Arch. Biochem. Biophys. **221**: 281-290

BURTON, G.W. (1990): Vitamin E: Antioxidant, activity, biokinetics, and bioavailability. Annu. Rev. Nutr. **10**: 357-382

BUTLER, J.A.; BEILSTEIN, M.A.; WHANGER, P.D. (1989): Influence of dietary methionine on the metabolism of selenomethionine in rats. J. Nutr. **119**: 1001-1009

CARLSON, B.A.; XU, X.-M.; GLADYSHEV, V.N.; HATFIELD, D.L. (2005): Selective rescue of selenoprotein expression in mice lacking a highly specialized methyl group in selenocysteine tRNA. J. Biol. Chem. **280**: 5542-5548

CASTEEL, S.W.; OSWEILER, G.D.; COOK, W.O.; DANIELS, G.; KADLEC, R. (1985): Selenium toxicosis in swine. JAVMA **186**: 1084-1085

CEMAZAR, M.; ZAHARIEV, S.; LOPEZ, J.J.; CARUGO, O.; JONES, J.A.; HORE, P.J.; PONGOR, S. (2003): Oxidative folding intermediates with nonnative disulfide bridges between adjacent cysteine residues. PNAS **100**: 5754-5759

CERMELLI, C.; VICENTI, M.; SCALTRITI, E.; BAZZANI, E.; BERETTI, F.; VIVOLI, G; PORTOLANI, M.: (2002): Selenite inhibition of coxsackie virus B5 replication: implications on the etiology of keshan disease. J. Trace Elem. Med. Biol. **16**: 41-46

CHANG, M.; BURGESS, J.R.; SCHOLZ, R.W.; REDDY, C.C. (1990): The induction of specific rat liver glutathione-S-transferase subunits und inadequate selenium nutrition causes an increase in prostaglandin $F_{2\alpha}$. J. Biol. Chem. **265**: 5418-5423

CHAUDIERE, J.; FERRARI-ILIOU, R. (1999): Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. Food and Chemical Toxicology **37**: 949-962

CHAVATTE, L.; BROWN II, B.A.; DRISCOLL, D.M. (2005): Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes. Nat. Struct. Mol. Biol. **12**:408-416

CHEN, C.-J.; HUANG, H.-S.; CHANG, W.-C. (2003): Depletion of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase up-regulates arachidonate metabolism by 12(S)-lipoxygenase and cyclooxygenase 1 in human epidermoid carcinoma A431 cells. FASEB J. **17**: 1694-1696

CHENG, W.-H.; FU, Y.X.; PORRES, J.M.; ROSS, D.A.; LEI, X.G. (1999a): Selenium-dependent cellular glutathione peroxidase protects mice against a pro-oxidant-induced oxidation of NADPH, NADH, lipids, and protein. FASEB J. **13**: 1467-1475

CHENG, W.-H.; QUIMBY, F.W.; LEI, X.G. (2003): Impacts of glutathione peroxidase-1 knockout on the protection by injected selenium against the pro-oxidant-induced liver aponecrosis and signaling in selenium deficient mice. Free Rad. Biol. Med. **34**: 918-927

CHENG, W.-H.; VALENTINE, B.A.; LEI, X.G. (1999b): High levels of dietary vitamin E do not replace cellular glutathione peroxidase in protecting mice from acute oxidative stress. J. Nutr. **129**: 1951-1957

CHO, C.; O´DELL BUNCH, D.; FAURE, J.-E.; GOULDING, E.H.; EDDY, E.M.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G. (1998): Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin β. Science **281**: 1857-1859

CHOMCZYSKI und SACCHI (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. **162**: 156-159

CHRISTENSEN, M.J.; BURGENER, K.W. (1992): Dietary selenium stabilizes glutathione peroxidase mRNA in rat liver. J. Nutr. **122**: 1620-1626

CHRISTENSEN, M.J.; CAMMACK, P.M.; WRAY, C.D. (1995): Tissue specificity of selenoprotein gene expression in rats. Nutr. Biochem. **6**: 367-372

CHRISTENSEN, M.J.; NELSON, B.L.; WRAY, C.D. (1994): Regulation of glutathione-S-transferases gene expression and activity by dietary selenium. Biochem. Biophys. Res. Commun. **202**: 271-277

CHU, F.F.; ESWORTHY, R.S.; DOROSHOW, J.H.; DOAN, K.; LIU, X.-F. (1992): Expression of plasma glutathione peroxidase in human liver in addition to kidney, heart, lung, and breast in humans and rodents. Blood **79**: 3233-3238

CLARK, L.C.; DALKIN, B.; KRONGRAD, A.; COMBS, G.F. Jr.; TURNBULL, B.W.; SLATE, E.H.; WITHERINGTON, R.; HERLONG, J.H.; JANOSKO, E.; CARPENTER, D.; BOROSSO, C.; FALK, S.; ROUNDER, J. (1998): Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial. Br. J. Urol. **81**: 730-734

COHEN, M.B.; DUVEL, D.L. (1988): Characterization of the inhibition of glutathione reductase and the recovery of enzyme activity in exponentially growing murine leukemia (L1210) cells treated with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. Biochem. Pharmacol. **37**: 3317-20.

COMBS, G.F. Jr. (2000): Food system-based approaches to improving micronutrient nutrition: The case for selenium. BioFactors **12**: 39-43

COMBS, G.F. Jr.; COMBS, S.B. (1986): The Role of Selenium in Nutrition. Academic Press Inc., Orlando

COMBS, G.F. Jr.; GRAY, W.P. (1998): Chemopreventive Agents: Selenium. Pharmacol. Ther. **79**: 179-192

COMPORTI, M. (1993): Lipid peroxidation. Biopathological significance. Molec. Aspects Med. **14**: 199-207

CONRAD, M.; JOKUPOGLU, C.; MORENO, S.G.; LIPPL, S.; BANJAC, A.; SCHNEIDER, M.; BECK, H.; HATZOPOULOS, A.K.; JUST, U.; SINOWATZ, F.; SCHMAHL, W.; CHIEN, K.; WURST, W.; BORNKAMM, G.W.; BRIELMEIER, M. (2004): Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. Mol. Cell. Biol. **24**: 9414-9423

CONRAD, M.; MORENO, S.G.; SINOWATZ, F.; URSINI, F.; KÖLLE, S.; ROVERI, A.; BRIELMEIER; M.; WURST, W.; MAIORINO, M.; BORNKAMM, G.W. (2005): The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. Mol. Cell Biol. **25**: 7637-7644

COPELAND, P.R.; FLETSCHER, J.E.; CARLSON, B.A.; HATFIELD, D.L.; DRISCOLL, D.M. (2000): A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. EMBO J. **19**: 306-314

COTTON, F.A.; WILKINSON, G. (1967): Anorganische Chemie. Verlag Chemie GmbH, Weinberg, New York und London

DANIELS, L.A. (1996): Selenium metabolism and bioavailability. Biol. Trace Elem. Res. **54**: 185-199

DARROW, R.A.; ORGANISCIAK, D.T. (1994): An improved spectrophotometric triiodide assay for lipid hydroperoxides. Lipids **29**: 591-594

DEAN, R.T.; DAVIES, M.J. (1997): Biochemistry and pathology of radical mediated damage to proteins. Biochem. J. **324**: 1-18

De HAAN, J.B.; BLADIER, C.; GRIFFITH, P.; KELNER, M.; O´SHEA, R.D.; CHEUNG, N.S.; BRONSON, R.T.; SILVESTRO, M.J.; WILD, S.; ZHENG, S.S.; BEART, P.M.; HERTZOG, P.J.; KOLA, I (1998): Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, GPx 1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. J. Biol. Chem. **273**: 22528-22563

DEMELASH, A.; KARLSSON, J.-O.; NILSSON, M.; BJÖRKMAN, U. (2004). Selenium has a protective role in caspase-3-dependent apoptosis induced by $H_2O_2$ in primary cultured pig thyrocytes. Eur. J. Endocrin. **150**: 841-849

DENEKE, S.M.; FANBURG, B.L. (1989): Regulation of cellular glutathione. Am. J. Physiol. **257**: L163-173

DICKINSON, D.A.; FORMAN, H.J. (2002): Cellular glutathione and thiols metabolism. Biochem. Pharmacol. **64**: 1019-1026

DING, F.; GRABOWSKI, P.J. (1999): Identification of a protein component of a mammalian $tRNA^{Sec}$ complex implicated in the decoding of UGA as selenocysteine. RNA **5**: 1561-1569

DIPLOCK, A.T. (1981): The Role of Vitamin E and Selenium in the Prevention of Oxygen-induced Tissue Damage. In: Spallholz, Martin und Ganther (eds.) Selenium in Biology and Medicine. Avi. Pub. Co. Wesport

DONG, J.-T. (2006): Prevalent mutations in prostate cancer. J. Cell. Biochem. **97**: 433-447

DONKOR, F.F.; MÖNNICH, M.; CZIRR, E.; HOLLEMANN, T.; HOYER-FENDER, S. (2004): Outer dense fiber protein 2 (Odf2) is a self-interacting centrosomal protein with affinity to microtubules. J. Cell. Sci. **117**: 4643-4651

DREHER, I.; SCHMUTZLER, C.; JAKOB, F.; KÖHRLE, J. (1997): Expression of selenoproteins in various rat and human tissues and cell lines. J. Trace Elem. Med. Biol. **11**: 83-91

DUFFIELD-LILLICO, A.J.; SLATE, E.H.; REID, M.E.; TURNBULL, B.W.; WILKINS, P.A.; COMBS, G.F. Jr.; PARK, H.K.; GROSS, E.G.; GRAHAM, G.F.; STRATTON, M.S.; MARSHALL, J.R.; CLARK, L.C. (2003): Selenium supplementation and secondary prevention of nonmelanoma skin cancer in a randomized trial. J. Nat. Canc. Inst. **95**: 1477-1481

EDMONDSON, A.J.; NORMAN, B.B.; SUTHER, D. (1993): Survey of state veterinarians and state veterinary diagnostic laboratories for selenium deficiency and toxicosis in animals. J. Am. Vet. Med. Assoc. **202**: 865-874

EL-SAYED, W.M.; ABOUL-FADL, T.; LAMB, J.G.; ROBERTS, J.C.; FRANKLIN, M.R. (2006): Effect of selenium-containing compounds on hepatic chemoprotective enzymes in mice. Toxicology **220**: 179-188

EPP, O.; LADENSTEIN, R.; WENDEL, A. (1983): The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. Eur. J. Biochem. **133**: 51-69

ESAKI, N.; NAKAMURA, T.; TANAKA, H. and SODA, K. (1982): Selenocysteine lyase, a novel enzyme that specifically acts on selenocysteine. J. Biol. Chem. **257**: 4386-4391

ESAKI, N.; TANAKA, H.; UEMARA, S.; SUZUKI, T.; SODA, K. (1979): Catalytic action of L-methionine-$\gamma$-lyase on selenomethionine and selenols. Biochemistry **18**: 407-410

ESTERBAUER, H. (1993): Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. Am. J. Clin. Nutr. **57**: 779S-786S

EUER, N.I.; KAUL, S.; DEISSLER, H.; MÖBUS, V.J.; ZEILLINGER, R.; WEIDLE, U.H. (2005): Identification of L1CAM, jagged2 and neuromedin U as ovarian cancer-associated antigens. Onocol. Rep. **13**: 375-387

EVANS, J.P. (2002): The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. Hum. Reprod. Update **8**: 297-311

EWAN, R.C. (1976): Effect of selenium on rat growth, growth hormone and diet utilization. J. Nutr. **106**: 702-709

FAGEGALTIER, D.; HUBERT, N.; YAMADA, K.; MIZUTANI, T.; CARBON, P., KROL, A. (2000): Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. EMBO J. **19**: 4796-4805

FAN, A.M.; KIZER, K.W. (1990): Selenium: Nutritional, toxicologic, and clinical aspects. West J. Med. **153**: 160-167

FAN, G.-C.; CHU, G.; KRANIAS, E.G. (2005): Hsp20 and its cardioprotection. TCM **15**: 138-141

FAUCHER, K.; RABINOVITCH-CHABLE, H.; COOK-MOREAU, J.; BARRIERE, G.; STURTZ, F.; RIGAUD, M. (2005): Overexpression of human GPx1 modifies Bax to Bcl-2 apoptotic ratio in human endothilial cells. Mol. Cell. Biochem. **277**: 81-87

FISCHER, A.; PALLAUF, J.; RIMBACH, G. (2002): Selenium- and vitamin E-dependent gene expression in rats: Analysis of differentially expressed mRNAs. Methods Enzymol. **347**: 267-276

FLETCHER, J.E.; COPELAND, P.R.; DRISCOLL, D.M.; KROL, A. (2001): The selenocysteine incorporation machinery: Interactions between the SECIS RNA and the SECIS-binding protein SBP2. RNA **7**: 1442-1453

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A.; SCHOCK, H.H. (1973): Glutathione Peroxidase: a selenoenzyme. FEBS Letters **32**: 132-134

FLOHÉ, L.; WINGENDER, E.; BRIGELIUS-FLOHÉ (1997): Regulation of Glutathione Peroxidases. In: H.J. Forman und E. Candenas. Oxidative Stress and Signal Transduction, Chapman and Hall titles, International Thomson Publishing

FORSTROM, J.W.; ZAKOWSKI, J.J.; TAPPEL, A.L. (1978): Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. Biochemistry **17**: 2639-2644

FOSTER, L.H.; SUMAR, S. (1997): Selenium in health and disease: A Review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **37**: 211-228

FRANKE, K.W. (1934): A new toxicant occurring in certain samples of plant foodstuffs. I. Results obtained in preliminary feed trials. In: Selenium in Nutrition. National Academic Press, Washington D.C.

FREI, B.; ENGLAND, L.; AMES, B.N. (1989): Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood. PNAS USA **86**: 6377-6381

FRIDOVICH, I. (1983): Superoxide radical, an endogenous toxicant. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicology **23**: 239-257

FU, Y.; CHENG, W.-H.; ROSS, D.A.; LEI, X.G. (1999): Cellular glutathione peroxidase protects mice against lethal oxidative stress induced by various doses of diquat. PSEBM. **222**: 164-169

FUCCI, L.; OLIVER, C.N.; COON, M.J.; STADTMAN, E.R. (1983): Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-funciton oxidation reactions: Possible implication in protein turnover and aging. PNAS **80**: 1521-1525

GAN, L.; LIU, Q.; XU, H.-B.; ZHU, Y.-S.; YANG, X.-Y. (2002): Effects of selenium overexposure on glutathione peroxidase and thioredoxin reductase gene expression and activities. Biol. Trace Elem. Res. **89**: 165-175

GANTHER, H.E. (1968): Selenotrisulfides. Formation by reaction of thiols with selenious acid. Biochemistry **7**: 2898-2905

GANTHER, H.R. (1971): Reduction of the selenotrisulfide derivative of glutathione to a persulfide analog by glutathione reductase. Biochemistry **10**: 4089-4098

GE, K.; YANG, G. (1993): The epidemiology of selenium deficiency in the etiological study of endmic diseases in China. Am. J. Clin. Nutr. **57**: 259S-263S

GELPI, C.; SONTHEIMER, E.J.; RODRIGUEZ-SANCHEZ, J.L. (1992): Autoantibodies against the serine tRNA-protein complex implicated in cotranslational selenocysteine insertion. PNAS **89**: 9739-9743

GIROTTI, A.W. (1998): Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. J. Lipid Res. **39**: 1529-1542

GLADYSHEV, V.N.; JEANG, K-T.; STADTMAN, T.C. (1996): Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene. PNAS **93**: 6146-6151

GODBOUT, R.; PACKER, M.; BIE, W. (1998): Overexpression of a DEAD box protein (DDX1) in neuroblastoma and retinoblastoma cell lines. J. Biol. Chem. **273**: 21161-21168

GRANER, E.; TANG, D.; ROSSI, S.; BARON, A.; MIGITA, T.; WEINSTEIN, L.J.; LECHPAMMER, M.; HUESKEN, D.; ZIMMERMANN, J.; SIGNORETTI, S.; LODA, M. (2004): The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. Can.Cell **5**: 253-261

GRIFFITH, O.W. (1980): Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Anal. Biochem. **106**: 207-212

GRIFFITH, O.W. (1999): Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. Free Rad. Biol. Med. **27**: 922-935

GROMER, S.; ARSCOTT, L.D.; WILLIAMS, C.H.; SCHIRMER Jr., R.; BECKER, K. (1998): Human placenta thioredoxin reductase. J. Biol. Chem. **273**: 20096-20101

GRONBAEK, H.; FRYSTYK, J.; FLYVBJERG, A. (1995): Effect of sodium selenite on growth, insulin-like growth factor-binding proteins and insulin-like growth factor-I in rats. J. Endocrin. **145**: 105-112

GUIMARAES, M.J.; PETERSON, D.; VICARI, A.; COCKS, B.G.; COPELAND, N.G.; GILBERT, D.J.; JENKINS, N.A.; FERRICKS, D.A.; KASTELEIN, R.A.; BAZAN, J.F. (1996): Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: Is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism. PNAS **93**: 15086-15091

GÜNTHER, T.; HÖLLRIEGL, V.; VORMANN, J.; BUBECK, J.; CLASSEN, H.G. (1994): Increased lipid peroxidation in rat tissues by magnesium deficiency and vitamin E depletion. Magnesium-Bulletin **16**: 38-43

GÜNZLER, W.A.; STEFFENS, G.J.; GROSSMANN, A.; KIM, S.M.; OTTING, F.; WENDEL, A.; FLOHÉ, L. (1984): The amino-acid sequence of bovine glutathione peroxidase. Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. **365**: 195-212

HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. (1981): Glutathione-S-Transferase (rat and human). Methods Enzymol. **77**: 218-231

HADLEY, K.B.; SUNDE, R.A. (2001): Selenium regulation of thioredoxin reductase activity and mRNA levels in rat liver. J. Nutr. Biochem. **12**: 693-702

HALLIWELL, B. (1990): How to characterize a biological antioxidant. Free. Rad. Res. Commun. **9**: 1-32

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. (1993): Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. Am. J. Clin. Nutr. **57**: 715S-725S

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. (1984): Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. J. **219**: 1-14

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. (1985): Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. (1989): Free radicals in biology and medicine. second edition Clarendon Press, Oxford

HALPNER, A.D.; HANDELMAN, G.J.; HARRIS, J.M.; BELMONT, C.A.; BLUMBERG, J.B. (1998): Protection by vitamin C of loss of vitamin E in cultured rat hepatocytes. Arch. Biochem. Biophys. **359**: 305-309

HARRISON, L.H.; COLVIN, B.M.; STUART, B.P.; SANGSTER, L.T.; GORGACZ, E.J.; GOSSER, H.S. (1983): Paralysis in swine due to focal symmetrical poliomalacia: Possible selenium toxicosis. Vet. Pathol. **20**: 265-273

HAYASHI, T.; KAGEYAMA, Y.; ISHIZAKA, K.; XIA, G.; KAZUNORI, KIHARA, OSHIMA, H. (2001): Requirement of notch1 and its Ligand jagged 2 expressions for spermatogenesis in rat and human testes. J. Androl. **22**: 999-1011

HAYASHI, T.; UENO, Y; OKAMATO, T. (1993): Oxidoreduktive regulation of nuclear factor kappa B. Involvement of a cellular reducing catalyst thioredoxin. J. Biol. Chem. **268**: 11380-11388

HAYES, J.D.; JUDAH, D.J.; McLELLAN, L.I.; KERR, L.A.; PEACOCK, S.D.; NEAL, G.E. (1991): Ethoxyquin-induced resistance to aflatoxin $B_1$ in the rat is associated with the expression of a novel alpha-class glutathione S-transferase subunit, $Yc_2$, which possesses high catalytic activity for aflatoxin $B_1$-8,9-epoxide. Biochem. J. **279**: 385-398

HELMY, M.H.; ISMAIL, S.S.; FAYED, H.; EL-BASSIOUNI, E.A. (2000): Effect of selenium supplementation on the activities of glutathione metabolizing enzymes in human hepatoma Hep G2 cell line. Toxicology **144**:57-61

HERDT; T.H.; RUMBEIHA, W.; BRASELTON, W.E. (2000): The use of blood analysis to evaluate mineral status in livestock. Toxicology **16**: 423-444

HILL, J.; ALLISON, F.; HALPIN, C. (1985): An episode of acute selenium toxicity in a commercial piggery. Aus. Vet. J. **62**: 207-209

HILL, K.E.; BURK, R.F. (1982): Effect of selenium deficiency and vitamin E deficiency on glutathione metabolism in isolated rat hepatocytes. J. Biol. Chem. **257**: 10668-10672

HILL, K.E.; BURK, R.F. (1985): Effect of selenium deficiency on the disposition of plasma glutathione. Arch. Biochem. Biophys. **240**: 166-171

HILL, K.E.; BURK, R.F. (2001): Selenoprotein P. In Hatfield (ed.) Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

HILL, K.E.; McCOLLUM, G.W.; BOEGLIN, M.E.; BURK, R.F. (1997b): Thioredoxin reductase activity is decreased by selenium deficiency. Biochem. Biophys. Res. Commun. **234**: 293-295

HILL, K.E.; MONTINE, T.J.; MOTLEY, A.K.; MAY, J.M.; BURK, R.F. (2003): Combined deficiency of vitamins E and C causes paralysis and death in guinea pigs. Am. J. Clin. Nutr. **77**: 1484-1488

HIRATSUKA, A.; YAMANE, H.; YAMAZAKI, S.; OZAWA, N.; WATABE, T. (1997): Subunit Ya-specific glutathione peroxidase activity toward cholesterol 7-hydroperoxide of glutathione-S-transferases in cytosols from rat liver and skin. J. Biol. Chem. **272**: 4763-4769

HIROTA, K.; MATSUI, M.; IWATA, S.; NISHIYAMA, A.; MORI, K.; YODOI, J. (1997): AP-1 transcriptional acitivity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. PNAS **94**: 3633-3638

HO, Y.S.; MAGNEAT, J.L.; BRONSON, R.T.; CAO, J.; GARGANO, M.; SUGAWARA, M.; FUNK, C.D. (1997): Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. J. Biol. Chem. **272**: 16644-16651

HOEHN, B.; YENARI, M.A.; SAPOLSKY, R.M.; STEINBERG, G.K. (2003): Gluthathione peroxidase overexpression inhibits cytochorme c release and proapoptotic mediators to protect neurons from experimental stroke. Stroke **34**: 2489-2494

HOFFMAN, D.J.; HEINZ, G.H.; KRYNITSKY, A.J. (1989): Hepatic glutathione metabolism and lipid peroxidation in response to excess dietary selenomethionine and selenite in mallard ducklings. J. Toxicol. Environ. Health **27**: 263-271

HONG, C.B.; CHOW, C.K. (1988): Induction of eosinophilic enteritis and eosinophilia in rats by vitamin E and selenium deficiency. Exp. Mol. Pathol. **48**: 182-192

HOUDE, C.; LI, Y.; SONG, L.; BARTON, K.; ZHANG, Q.; GODWIN, J.; NAND, S.; TOOR, A.; ALKAN, S.; SMADJA, N.V.; AVET-LOISEAU, H.; LIMA, C.S.; MIELE, L.; COIGNET, L.J. (2004): Overexpression of the NOTCH ligand JAG2 in malignant plasma cells from multiple myeloma patient cell lines. Blood **104**: 3697-3704

HOYER-FENDER, S.; NEESEN, J.; SZPIRER, J.; SZPIRER, C. (2003): Genomic organisation and chromosomal assignment of Odf2 (outer dense fiber 2), encoding the main component of sperm tail outer dense fibers and a centrosomal scaffold protein. Cytogenet. Genome Res. **103**: 122-127

HSIEH, H.S.; GANTHER, H.E. (1977): Biosynthesis of dimethyl selenide from sodium selenite in rat liver and kidney cell-free systems. Biochim. Biophys. Acta. **497**: 205-217

HUBER, R.E.; CRIDDLE, R.S. (1967): Comparison of the chemical properties of selenocysteine and selenocystine with their sulfur analogs. Arch. Biochem. Biophys. **122**: 164-173

HURST, R.; BAO, Y.; JEMTH, P.; MANNERVIK, B.; WILLIAMSON, G. (1998): Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione peroxidases. Biochem. J. **332**: 97-100

HUSSAIN, S.P.; HARRIS, C.C. (2006): p53 biological network: At the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis. J. Nippon Med. Sch. **73**: 54-64

HWANG, C.; SINSKEY, A.J.; LODISH, H.F. (1992): Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. Science **257**: 1496-1502

IMAI, H.; NARASHIMA, K.; ARAI, M.; SAKAMOTO, H.; CHIBA, N.; NAKAGAWA, Y. (1998): Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. J. Biol. Chem. **273**: 1990-1997

IP, C. (1998): Lessons from Basic Research in Selenium and Cancer Prevention. J. Nutr. **128**: 1845-1854

IP, C.; THOMPSON, H.J.; ZHU, Z.; GANTHER, H.E. (2000): In vitro and in vivo studies of methylseleninic acid: Evidence that a monomethylated selenium metabolite is critical for cancer prevention. Cancer Res. **60**: 2882-2886

IRVIN, D.K.; NAKANO, I.; PAUCAR, A.; KORNBLUM, H.I. (2004): Patterns of jagged1, jagged2, delta-like 1 and delta-like 3 expression during late embryonic and postnatal brain development suggest multiple functional roles in progenitor and differentiated cells. J. Neurosci. Res. **75**: 330-343

IYER, R.S.; COLES, B.F.; RANEY, K.D.; THIER, R.; GUENGERICH, F.P.; HARRIS, T. (1994): DNA adduction by the potent carcinogen aflatoxin $B_1$: Mechanistic studies. J. Am. Chem. Soc. **116**: 1603-1609

JAGHORBANI, M.; RAMON, F.M.; KASPER, L.J.; SUN, X.F.; YOUNG, V.R. (1990): The selenite-exchangable metabolic pool in humans: A new concept for the assessment of selenium status. Am. J. Clin. Nutr. **51**: 670-677

JAKOBY, W.B.; HABIG, W.H.; KEEN, J.H.; KETLEY, J.N.; PABST, M.J. (1976): Glutathione-S-Transferases: Catalytic Aspects. In: Arias und Jacoby (eds.) Glutathione: Metabolism and Functions. Raven Press, New York

JENKINSON, S.G.; SPENCE, T.H.; LAWRENCE, R.A.; HILL, K.E.; DUNCAN, C.A.; JOHNSON, K.H. (1987): Rat lung glutathione release: response to oxidative stress and selenium deficiency. J. Appl. Physiol. **62**: 55-60

JOKUPOGLU, C.; PRZEMECK, G.K.H.; SCHNEIDER, M.; MORENO, S.G.; MAYR, N.; HATZOPOULOS, A.K.; HRABE de ANGELIS, M.; WURST, W.; BORNKAMM, G.W.; BRIELMEIER, M.; CONRAD, M. (2005): Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryongenesis but dispensable for cardiac development. Mol. Cell. Biol. **25**: 1980-1988

JUDAH, D.J.; HAYES, J.D.; YANG, J.-C.; LIAN, L.-Y.; ROBERTS, G.C.K.; FARMER, P.B.; LAMB, J.H.; NEAL, G.E. (1993): A novel aldehyde reductase with activity towards metabolite of aflatoxin $B_1$ is expressed in rat liver during carcinogenesis and following the administration of an antioxidant. Biochem. J. **292**: 13-18

KALYANARAMAN, B.; KAROUI, H.; SINGH, R.J.; FELIX, C.C. (1996): Detection of thiyl radical adducts formed during hydroxyl radical- and peroxynitrite-mediated oxidation of thiols – A high resolution ESR spin-trapping study at Q-band (35 GHz). Anal. Biochem. **241**: 75-81

KANAI, Y.; DOHMAE, N.; HIROKAWA, N. (2004): Kinesin transports RNA: Isolation and characterization of an RNA-transporting granule. Neuron **43**: 513-525

KANNAN, K.; JAIN, S.K. (2000): Oxidative stress and apoptosis. Pathophysiology **7**(27): 153-163

KAYANOKI, Y.; FUJII, J.; ISLAM, K.N.; SUZUKI, K.; KAWATA, S.; MATSUZAWA, Y.; TANIGUCHI, N. (1996): The protective role of glutathione peroxidase in apoptosis induced by reactive oxygen species. J. Biochem. **119**: 817-822

KIERZENBAUM, A.L. (2002): Keratins: Unraveling the coordinated construction of scaffolds in spermatogenic cells. Mol. Reprod. Dev. **60**: 1-2

KOBAYASHI, Y.; OGRA, Y.; ISHIWATA, K.; TAKAYAMA, H.; AIMI, N.; SUZUKI, K.T. (2002): Selenosugars are key urinary metabolites for selenium excretion within the required to low-toxic range. PNAS **99**: 15932-15936

KÖHRLE, J. (2005): Selenium and the control of thyroid hormone metabolism. Thyroid **15**: 841-853

KÖHRLE, J.; BRIGELIUS-FLOHE, R.; BÖCK, A.; GÄRTNER, R.; MEYER, O.; FLOHE, L. (2000): Selenium in biology: Facts and medical perspectives. Biol. Chem. **381**: 849-864

KRISHNAN, V.; ZEICHNER, S.L. (2004): Alterations in the expression of DEAD-box and other RNA binding proteins during HIV-1 replication. Retrovirology **1**: 42-46

KRYUKOV, G.V.; KRYUKOV, V.M.; GLADYSHEV, V.N. (1999): New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. J. Biol. Chem. **274**: 33888-33897

KUNO, K.; KANADA, N.; NAKASHIMA, E.; FUJIKI, F.; ICHIMURA, F.; MATSUSHIMA, K. (1997): Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. J. Biol. Chem. **272**: 556-562

LANGHANS, W. (1986): Pathophysiologie der Inappetenz. J. Vet. Med. A **33**: 414-421

LATHAM, R. (1958): The travels of Marco Polo. Penguin Books, New York

LAWRENCE, R.A.; BURK, R.F. (1976): Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. **71**: 952-957

LAWRENCE, R.A.; PARKHILL, L.K.; BURK, R.F. (1978): Hepatic cytosolic non selenium-dependent glutathione peroxidase activity: Its nature and the effect of selenium deficiency. J. Nutr. **108**: 981-987

LeBOEUF, R.A.; HOEKSTRA, W.G. (1983): Adaptive changes in hepatic glutathione metabolism in response to excess selenium in rats. J. Nutr. **113**: 845-854

LeBOEUF, R.A.; ZENTNER, K.L.; HOEKSTRA, W.G. (1985): Effect of dietary selenium concentration and duration of selenium feeding on hepatic glutathione concentration in rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **180**: 348-352

LEE, B.J.; WORLAND, P.J.; DAVIS, J.N.; STADTMAN, T.C.; HATFIELD, D.L. (1989): Identification of a selenocysteyl-tRNA$^{ser}$ in mammalian cells that recognize the nonsense codon, UGA. J. Biol. Chem. **264**: 9724-9727

LEE, H.-S.; CSALLANY, A.S. (1994): The influence of vitamin E and selenium on lipid peroxidation and aldehyde dehydrogenase activity in rat liver and tissue. Lipids **29**: 345-350

LEE, S.R.; BAR-NOY, S.; KWON, J.; LEVINE, R.L.; STADTMAN, T.C.; RHEE, S. G. (2000): Mammalian thioredoxin reductase: Oxidation of the C-terminal cysteine/selenocysteine active site forms a thioselenide, and replacement of selenium with sulphur markedly reduces catalytic activity. PNAS **97**: 2521-2526

LEE, S-R.; KIM, J.-R.; KWON, K.-S.; YOON, H.W.; LEVINE, R.L.; GINSBURG, A.; RHEE, S.G. (1999): Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredxin reductase from rat liver. J. Biol. Chem. **274**: 4722-4734

LEI, X.G.; EVENSON, J.; THOMPSON, K.M.; SUNDE, R.A. (1995): Glutathione geroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium. J. Nutr. **125**: 1438-1446

LEI, X.G.; DANN, H.M.; ROSS, D.A.; CHENG, W-H.; COMBS JR., G.F.; RONEKER, K.R. (1998): Dietary selenium supplementation is required to support full expression of three selenium-dependant glutathione peroxidases in various tissues of weanling pigs. J. Nutr. **128**: 130-135

LEI, X.G.; ROSS, D.A.; PARKS, J.E.; COMBS JR., G.F. (1997): Effects of dietary selenium and vitamin E concentrations on phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expression in reproductive tissue of pubertal maturing male rats. Biol Trace Elem. Res. **59**: 195-206

LESCURE, A.; GAUTHERET, D.; CARBON, P.; KROL, A. (1999): Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif. J. Biol. Chem. **274**: 38147-38154

LEVINE, R.L. (1983): Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. J. Biol. Chem. **258**: 11823-11827

LEVINE, R.L. (1984): Mixed-function oxidation of histidine residues. Methods Ezymol. **107**: 370-376

LEVANDER, O.A., BECK, M.A. (1997): Interacting nutritional and infectious etiologies of keshan disease. Insights from coxsackie virus B-induced myocarditis in mice deficient in selenium or vitamin E. Biol. Trace Elem. Res. **56**: 5-21

LOW, S.C.; HARNEY, J.W.; BERRY, M.J. (1995): Cloning and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. J Biol Chem. **270**: 21659-21664

LUNDSTROM, J.; HOLMGREN, A. (1990): Protein disulfideisomerase is a substrate for thioredoxin reductase and has thioreductase-like activity. J. Biol. Chem. **265**: 9114-9120

LUPERCHIO, S.; TAMIR, S.; TANNENBAUM, S.R. (1996): NO-induced oxidative stress and glutathione metabolism in rodent and human cells. Free Rad. Biol. Med. **21**: 513-519

LYNGBAEK, S.; ADAMSEN, S.; ARU, A.; BERGENFELDT, M. (2006): Recurrent acute pancreatitis due to eosinophilic gastroenteritis. Case report and literature review. J. Pancreas **7**: 211-217

MA, S., CHARRON, J.; ERIKSON, R.L. (2003): Role of Plk2 (Snk) in mouse development and cell proliferation. Mol. Cell. Biol. **23**: 6936-6943

MACHLIN, L.J.; BENDICH, A. (1987): Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. In: Symposium presented by the American Institute of Nutrition at the 71st Annual Meeting of th Federation of American Societies for Experimental Biology, Washington D.C.

MAHAN, D.C.; Cline, T.R.; Richert, B. (1999): Effects of dietary levels of selenium enriched yeast and sodium selenite selenium sources fed to grower-finisher pigs on performance, tissue selenium, serum glutathione peroxidase activity, carcass characteristics and loin quality. J. Anim. Sci. **77**: 2172-2179

MAIORINO, M.; AUMANN, K.D.; BRIGELIUS-FLOHE, R.; DORIA, D.; VANDENHEUVAL, J., McCARTHY, J. et al. (1995): Probing the presumed catalysis triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). Biol. Chem. Hoppe Seyler **376**: 651-660

MAIORINO, M.; COASSIN, M.; ROVERI, A.; URSINI, F. (1989): Microsomal lipid peroxidation: Effect of vitamin E and its functional interaction with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Lipids **24**: 721-726

MAIORINO, M. GREGOLIN, C.; URSINI, F. (1990): phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Methods Enzymol. **186**: 448-457

MAIORINO, M.; ROVERI, A.; BENAZZI, L.;BOSELLO, V.; MAURI, P.; TOPPO, S.; TOSATTO, S.C.E.; URSINI, F. (2005): Functional interaction of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein discloses the adjacent cysteine motif as a new substrate of the selenoperoidase. J. Biol. Chem. **280**: 38395-38402

MANNERVIK, B.; ALIN, P.; GUTHENBERG, C.; JENSSON, H.; TAHIR, M.K.; WARHOLM, M.; JÖRNVALL, H. (1985): Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: Correlation between structural data and enzymatic properties. PNAS **82**: 7202-7206

MARKANT, A.; RIMBACH, G.; KRÄMER, K.; MAYER, H.; PALLAUF, J. (1995): Reaktive Sauerstoffradikale: Entstehung, Wirkung, Eliminierung. PZ **26:** 9-26

MASUI, T.; HOSOTANI, R.; TSUJI, S.; MIYAMOTO, Y.; YASUDA, S.; IDA, J.; NAKAJIMA, S.; KAWAGUCHI, M.; KOBAYASHI, H.; KOIZUMI, M.; TOYODA, E.; TULACHAN, S.; ARII, S.; DOI, R.; IMAMURA, M. (2001): Expression of METH-1 and METH-2 in pancreatic cancer. Clin. Canc. Res. **7**: 3437-3443

MASUKAWA, T.; NISHIMURA, T.; IWATA, H. (1984): Differential Changes of glutathione-S-transferases activity by dietary selenium. Biochem. Pharmacol. **33**: 2635-2639

MATSUDA, A.; MIEKO, K., ITOKAWA, Y. (1998): Influence of selenium deficiency on vital functions in rats. Biol. Trace Elem. Res. **61**: 287-301

MAURI, P.; BENAZZI, L.; FLOHÉ, L.; MAIORINO, M.; PIETTA, P.G.; PILAWA, S.; ROVERI, A.; URSINI, F. (2003): Versatility of selenium catalysis in PHGPx unraveled by LC/ESI-MS/MS. Biol. Chem. **384**: 575-588

MAY, J.M.; COBB, C.E.; MENDIRATTA, S.; HILL, K.E.; BURK, R.F. (1998): Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. J. Biol. Chem. **273**: 23039-23045

MAY, J.M.; MENDIRATTA, S.; HILL, K.E.; BURK, R.F. (1997): Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. J. Biol. Chem. **272**: 22607-22610

McCONNELL, K.P.; PORTMAN, O.W. (1952): Toxicity of dimethylselenide in the rat and mouse. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **79**: 230-231

McCORD, J.M. (2000): The evolution of free radicals and oxidative stress. Am. J. Med. **108**: 652-659

McLEOD, R.; ELLIS, E.M.; ARTHUR, J.R.; NEAL, G.E.; JUDAH, D.J.; MANSON, M.M.; HAYES, J.D. (1997): Protection conferrd by selenium deficiency against aflatoxin $B_1$ in the rat is associated with the hepatic expression of an aldo-keto reductase and a glutathione S-transferase subunit that metabolize the mycotoxin. Cancer Res. **57**: 4257-4266

MEHLERT, A.; DIPLOCK, A.T. (1985): The glutathione-S-transferases in selenium and vitamin E deficiency. Biochem. J. **227**: 823-831

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. (1983): Glutathione. Ann. Rev. Biochem. **52**: 711-760

MICHIELS, C.; RAES, M.; TOUSSAINT, O.; REMACLE, JOSE´ (1994): Imporatance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. Free Rad. Biol. Med. **17**: 235-248

MILLER, R.A.; BRITIGAN, B.E. (1997): Role of oxidants in microbial pathophysiology. Clin. Microbiol. Rev. **10**: 1-18

MILLER, R.E.; HACKENBERG, R.; GERSHMAN, H. (1978): Regulation of glutamine synthetase in cultured 3T3-L1 cells by insulin, hydrocortisone, and dibutyryl cyclic AMP. PNAS **75**: 1418-22

MILLS, G.C. (1957): Hemoglobin catabolism I. Glutathione peroxidase, and erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. J. Biol. Chem. **299**: 189-197

MITTAZ, L.; RUSSELL, D.L.; WILSON, T.; BRASTED, M.; TKALCEVIC, J.; SALAMONSEN, L.A.; HERTZOG, P.J.; PRITCHARD, M.A. (2004): Adamts-1 is essential for the development and function of the urogenital system. Biol. Reprod. **70**: 1096-1105

MIZUTANI, T. (1989): Some evidence of the enzymatic conversion of bovine suppressor phosphoseryl-tRNA to selenocysteyl-RNA. FEBS Letters **250**: 142-146

MIZUTANI, T.; KURATA, H.; YAMADA, M. (1991): Study of mammalian selenocysteyl-tRNA synthesis with [$^{75}$Se]HSe$^-$. FEBS Letters **289**: 59-63

MIZUTANI, T.; KURATA, H.; YAMADA, K.; TOTSUKA, T. (1992): Some properties of murine selenocysteine synthase. Biochem J. **284**: 827-834

MOAK, M.A.; CHRISTENSEN, M.J. (2001): Promotion of lipid oxidation by selenate and selenite and indicators of lipid peroxidation in the rat. Biol. Trace Elem. Res. **79**: 257-269

MONTUSCHI, P.; BARNES, P.J.; ROBERTS II, L.J. (2004): Isoprostanes: Markers and mediators of oxidative stress. FASEB J. **18**: 1791-1800

MORENO-REYES, R.; EGRISE, D.; NEVE, J.; PASTEELS, J.-L.; SCHOUTENS, A. (2001): Selenium deficiency-induces growth retardation is associated with an impaired bone metabolism and osteopenia. J. Bone Min. Res. **16**: 1556-1563

MORENO-REYES, R.; SUETENS, C.; MATHIEU, F.; BEGAUX, F.; ZHU, D.; RIVERA, M.T.; BOELART, M.; NEVE, J.; PERLMUTTER, N.; VANDERPAS, J. (1998): Kashin-Beck osteoarthropathy in rural tibet in relation to selenium and iodine status. New England J. Med. **339**: 1112-1120

MORIARTY, P.M.; REDDY, C.C.; MAQUAT, L.E. (1998): Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA. Mol. Cell. Biol. **18**: 2932-2939

MÜLLER, C.; WINGLER, K.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R. (2003): 3´UTRs of glutathione peroxidases differentially affect selenium-dependent mRNA stability and selenocysteine incorporation efficiency. Biol. Chem. **384**: 11-18

MULLINEAUX, P.M.; CREISSEN, G.P. (1997): Glutathione Reductase: Regulation and Role in Oxidative Stress. In: Scandalios (ed.) Oxidative Stress and the Molcular Biology of Antioxidant Defense. Cold Spring Harbor Laboratory Press

MYKKANEN, H.M.; WASSERMAN, R.H. (1989): Uptake of $^{75}$Se-selenite by brush border membrane vesicles from chick duodenum stimulated by vitamin D. J. Nutr. **119**: 242-247

MYKKANEN, H.M.; WASSERMAN, R.H. (1990): Relationship of membrane-bound sulfhydryl groups to vitamin D-stimulated uptake of [75Se]selenite by the brush border membrane vesicles from chick duodenum. J. Nutr. **120**: 882-888

NAGASE, H.; KASHIWAGI, M. (2003): Aggrecanases and cartilage matrix degradation. Arth. Res. Ther. **5**: 94-103

NAGY, E.; MAQUAT, L.E. (1998): A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. TIBS **23**: 198-199

NAKAGAWA, Y. (2004): Role of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) as an antiapoptotic factor. Biol. Pharm. Bull. **27**: 956-960

NAKAGAWA, Y.; YAMANE, Y.; OKANOUE, T.; TSUKITA, S.; TSUKITA, S. (2001): Outer dense fiber 2 is a widespread centrosome scaffold component prefentially associated with mother centrioles: Its identifacation from isolated centrosomes. Mol. Biol. Cell **12**: 1687-1697

NAKAMURO, K.; OKUNO, T.; HASEGAWA, T. (2000): Metabolism of selenoamino acids and contribution of selenium methylation to their toxicity. J Hlth. Sci. **46**: 418-421

NAKAMURA, K.; OLIVER, C.N.; STADTMAN, E.R. (1985): Inactivation of glutamine synthetase by a purified rabbit liver microsomal cytochrome P-450 system. Arch. Biochem. Biophys. **240**: 319-329

NAKAMURA, K.; STADTMAN, E.R. (1984): Oxidative inactivation of glutamine synthetase subunits. PNAS **81**: 2011-2015

NAKANE, T.; ASAYAMA, K.; KODERA, K.; HAYASHIBE, H.; UCHIDA, N.; NAKAZAWA, S. (1998): Effect of selenium deficiency on cellular and extracellular glutathione peroxidases: Immunochemical detection on mRNA analysis in rat kidney and serum. Free Radic. Biol. Med. **25**: 504-511

NASIM, M.T.; JAENECKE, S.; BELDUZ, A.; KOLLMUS, H.; FLOHÉ, L.; McCARTHY, J.E.G. (2000): Eukaryotic selenocysteine incorporation follows a nonprocessive mechanism that competes with translational termination. J. Biol. Chem. **275**: 14846-14852

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC) (1995): Nutrient Requirements of Laboratory Animals. 4th revised Edition. National Academies Press, Washington D.C.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC) (2005): Mineral Tolerance of Animals. 2nd revised Edition. National Academies Press, Washington D.C.

NAUMANN, C.; BASSLER, R. (1997): Methodenbuch Band III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln, 4. Ergänzungslieferung. VDLUFA-Verlag, Darmstadt

NEAL, G.E.; COLLEY, P.J. (1979). The formation of 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy aflatoxin $B_1$ by the metabolism of aflatoxin $B_1$ in vitro by rat liver microsomes. FEBS Letters **101**: 382-386

NISHIMURA, H.; CHO, C.; BRANCIFORTE, D.R.; MYLES, D.G.; PRIMAKOFF, P. (2001): Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyristestin or fertilin β. Dev. Biol. **233**: 204-213

NISHIMURA, H.; KIM, E.; NAKANISHI, T.; BABA, T. (2004): Possible function of the ADAM1a/ADAM2 fertilin complex in the appearance of ADAM3 on the sperm surface. J. Biol. Chem. **279**: 34957-34962

NONN, L.; WILLIAMS, R.R.; ERICKSON, R.P.; POWIS, G. (2003): The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. Mol. Cell. Biol. **23**: 916-922

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S. (2001): Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Rad. Biol. Med. **31**: 1287-1312

OBERMEYER, B.D.; PALMER, I.S.; OLSON, O.E.; HALVERSON, A.W. (1971): Toxicity of trimethylselenoium chloride in the rat with and without arsenite. Toxicol. App. Pharmacol. **20**: 135-146

OGRA, Y.; ISHIWATA, K.; TAKAYAMA, H.; AIMI, N.; SUZUKI, K.T. (2002): Identification of a novel selenium metabolite, Se-methyl-N-acetylselenohexosamine, in rat urine by high-performance liquid chromatography- inductively coupled plasma mass spectometry and –elektrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Chrom. B. **767**: 301-312

PADAYATTY, S.J.; KATZ, A.; WANG, Y.; ECK, P.; KWON, O.; LEE, J.-H.; CHEN, S.; CORPE, C.; DUTTA, A.; DUTTA, S.; LEVINE, M. (2003): Vitamin C as and antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. J. Am. Coll. Nutr. **22**: 18-35

PALLAUF, J.; MÜLLER, A.S. (2006): Inorganic feed additives. In: Mosenthin, R.; Zentek, J.; Zebrowska, T. (eds.) Biology of Nutrition in Growing Animals, Elsevier, London

PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. (1967): Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. J. Lab. & Clin. Med. **70**: 158-169

PAINTER, E.P. (1941): The chemistry and toxicity of selenium compounds with special reference to the selenium problem. Chem. Rev. **28**: 179 213

PFEIFER, H.; CONRAD, M.; ROETHLEIN, D.; KYRIAKOPOULOS, A.; BRIELMEIER, M.; BORNKAMM, G.W.; BEHNE, D. (2001): Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. FASEB **15**: 1236-1238

PORTER, S.; CLARK, I.M.; KEVORKIAN, L.; EDWARDS, D.R. (2005): The ADAMTS metalloproteinases. Biochem. J. **386**: 15-27

PROHASKA, J.R.; GANTHER, H.E. (1977): Glutathione peroxidase activity of glutathione-S-transferases purified from rat liver. Biochem Biophys Res Commun. **76**: 437-445

PRYOR, W.A. (2000): Vitamin E and heart disease: Basic science to clinical intervention trials. Free Rad. Biol. Med. **28**: 141-164

PULFORD, D.J.; HAYES, J.D. (1996): Characterization of the rat glutathione S-transferase $Yc_2$ subunit gene, GSTA5: identification of a putative antioxidant-responsive element in the 5´-flanking region of rat GSTA5 that may mediate chemoprotection against aflatoxin $B_1$. Biochem. J. **318**: 75-84

RAHMAN, I.; BEL, A.; MULIER, B.; LAWSON, M.F.; HARRISON, D.J.; MACNEE, W.; SMITH, C.A.D. (1996): Transcriptional regulation of γ-glutamylcysteine synthetase-heavy subunit by oxidants in human alveolar epithelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. **229**: 832-837

RAYMANN, M.P. (2002): The argument for increasing selenium intake. Proceedings of the Nutrition Society **61**: 203-215

REEVES, P.G. (1997): Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. J. Nutr. **127**: 838S-841S

REQUENA, J.R.; CHAO, CHIEN-CHUNG; LEVINE, R.L.; STADTMAN, E.R. (2003): Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. PNAS **98**: 69-74

REZNICK, A.Z.; PACKER, L. (1994): Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. Methods Enzymol. **233**: 357-363

RICCI, G.; CACCURI, A.M.; BELLO, M.L.; PASTORE, A.; PIEMONTE, F.; FEDERICI, G. (1994): Colorimetric and fluorometric assays of glutathione transferase based on 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. Anal. Biochem. **218**: 463-465

ROCHER, C.; LALANNE, J.L.; CHAUDIERE, J. (1992): Purifications and properties of a recombinant sulfur ananlog of murine selenium-glutathione peroxidase. Eur. J. Biochem. **205**: 955-960

ROSENFELD, I. und BEATH, O.A. (1964): Selenium: Geobotany, Biochemistry, Toxicity and Nutrition. Academic Press, New York London.

ROSSOW, N.; BOLDUAN, G. (1994): Stoffwechselstörungen bei Haustieren. G. Fischer Verlag, Stuttgart

ROTRUCK, J.T.; POPE, A.L.; GANTHER, H.E.; HAFEMAN, D.G.; SWANSON, A.B. and HOEKSTRA, W.G. (1973): Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. Science **179**: 588

ROVERI, A.; MAIORINO, M. and URSINI, F. (1994): Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane-bound phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Methods Enzymol. **203**: 202-212

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: S. Krawetz, S. Misener (eds.) Bioinformatics Methods and Protocols in the series Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.J.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; Erlich, H.A.; ARNHEIM, N. (1985): Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science **230**: 1350-1354

SAIKUMAR, P.; DONG, Z.; MIKHAILOV, V.; DENTON, M.; WEINBERG, J.M.; VENKATACHALAM, M.A. (1999): Apoptosis: Definition, mechanisms, and relevance to disease. Am. J. Med. **107**: 489-506

SAITOH, M.; NISHITOH, H.; FUJII, M.; TAKEDA, K.; TOBIUME, K.; SAWADA, Y.; KAWABATA, M.; MIYAZONO, K.; ICHIJO, H. (1998): Mammalian thioredoxin is a director inhibitor of apoptosis signal-regulating kinate (ASK) 1. EMBO J. **17**: 2596-2606

SAKURAI, A.; YUASA, K.; SHOJI, Y.; HIMENO, S.; TSUJIMOTO, M.; IMURA, N.; HARA, S. (2004): Overexpression of thioredoxin reductase 1 regulates NF-κB activation. J. Cell. Physiol. **198**: 22-30

SANDALOVA, T.; ZHONG, L.; LINDQVIST, Y.; HOLMGREN, A.; SCHNEIDER, G. (2001): Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: Implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme. PNAS **98**: 9533-9538

SANDHOLM, M. (1973): The initial fate of a trace amount of intravenously administered selenite. Acta Pharmacol. Toxicol. **33**: 6-16

SCHARRER, E.; SENN, E.; WOLFFRAM, S. (1992): Stimulation of mucosal uptake of selenium from selenite by some thiols at various sites of the intestine. Biol. Trace Elem. Res. **33**: 109-120

SCHEINERT, P.; BEHRENS, B.; KAHLE, D. (1995): Optimizing DNA amplifikation protocols using the Eppendorf® Mastercycler®. Biochemica Medica 5: 95-102 (www.eppendorfna.com/applications/PCR)

SCHNURR, K.; BELKNER, J.; URSINI, F.; SCHEWE, T.; KÜHN, H. (1996): The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase controls the activity of the 15-lipoxygenase with complex substrates and preserves the specificity of the oxygenation products. J. Biol. Chem. **271**: 4653-4658

SCHWARZ, K.; FOLTZ, C.M. (1957): Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. J. Am. Chem. Soc. **79**: 3292-3293

SCHWARTZMAN, R.A.; CIDLOWSKI, J.A. (1993): Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. Endocrine Rev. **14**: 133-151

SCOTT, M.L. (1987): Nutrition of the Turkey. M.L. Scott of Ithaca, Ithaca

SEKO, Y.; SAITO, Y.; KITAHARA, J.; IMURA, N. (1989): Active oxygen generation by the reaction of selenite with reduced glutathione in vitro. In: Wendel (ed.) Selenium in Biology and Medicine. Springer Verlag, Berlin

SEALS, D.F.; COURTNEIDGE, S.A. (2006): The ADAMs family of metalloproteinases: Mulitdomain proteins with multiple functions. Genes Dev. **17**: 7-30

SENN, E.; SCHARRER, E.; WOLLFFRAM, S. (1992): Effects of glutathione and of cysteine on intestinal absorption of selenium from selenite. Biol. Trace Elem. Res. **33**: 103-108

SHALGI, R.; SELIGMAN, J.; KOSOWER, N.S. (1989): Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: Analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane. Biol. Reprod. **40**: 1037-1045

SHEN, H.-M.; LIU, Z.-G. (2006): JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. Free Rad. Biol. Med. **40**: 928-939

SHEN, H.-M.; YANG, C.-F.; LIU, J.; ONG, C.-N. (2000): Dual role of glutathione in selenite induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma cells. Free Rad. Biol. Med. **28**: 1115-1124

SHIBATA, Y.; MORITA, M.; FUWA, K. (1992): Selenium and arsenic in biology: Their chemical forms and biological functions. Adv. Biophys. **28**: 31-80

SHIDOJI, Y.; OKAMOTO, K.; MUTO, Y.; KOMURA, S.; OHISHI, N. (2006): Prevention of geranylgeranoic acid-induced apoptosis by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene. J. Cell. Biochem. **97**: 178-187

SHINDO, T.; KURIHARA, H.; KUNO, K.; YOKOYAMA, H.; WADA, T.; KURIHARA, Y.; IMAI, T.; WANG, Y.; OGATA, M.; NISHIMATSU, H.; MORIYAMA, N.; OH-HASHI, Y.; MORITA, H.; ISHIKAWA, T.; NAGAI, R.; YAZAKI, Y.; MATSUSHIMA, K. (2000): ADAMTS-1: A metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. J. Clin. Invest. **105**: 1345-1352

SHIOBARA, Y.; OGRA, Y.; SUZUKI, K.T. (1999): Speciation of metabolites of selenate in rats by HPLC-ICP-MC. Analyst **124**: 1237-1241

SHOZU, M.; MINAMI, N.; YOKOYAMA, H.; INOUE, M.; KURIHARA, H.; MATSUSHIMA, K.; KUNO, K. (2005): ADAMTS-1 is involved in normal follicular development, ovulatory process and organization of the medullary vascular network iin the ovary. J. Mol. Endocrin. **35**: 343-355

SIES, H. (1991a): Oxidative Stress: Introduction. In: Sies (ed.) Oxidative Stress (Oxidants and Antioxidants). Academic Press, New York

SIES, H. (1991b): Oxidative stess: from basic research to clinical application. Am. J. Med. **91**: 31S-38S

SIES, H. (1999): Glutathione and its role in cellular functions. Free Rad. Biol. Med. **27**: 916-921

SINGHAL, S.S.; SAXENA, M.; AHMAD, H.; AWASTHI, S.; HAQUE, A.K.; AWASTHI, Y.C. (1992): Glutathine-S-Transferase of human lung: Characterization and evaluation of the protective role of the $\alpha$-class isoenzymes against lipid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. **299**: 232-241

SMITH, P.; SYED, N.; CROOK, T. (2006): Epegenetic inactivation implies a tumor suppressor function in hematologic malignancies for polo-like kinase 2 but not polo-like kinase 3. Cell Cycle **5**: 1262-1264

SPALLHOLZ, J.E. (1994): On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. Free Radic. Biol. Med. **17**: 45-64

STADTMAN, E.R.; BERLETT, B.S. (1997): Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. Chem. Res. Toxicol. **10**: 485-494

STADTMAN, T.C. (1996): Selenocysteine. Ann. Rev. Biochemistry **65**: 83-100

STARK, G. (2005): Functional consequences of oxidative membrane damage. J. Membrane Biol. **205**: 1-16

STARKE-REED, P.E.; OLIVER, C.N. (1988): Oxidative modification of enzymes during aging and acute oxidative stress. Basic Life Sci. **49**: 537-540

STARKE-REED, P.E.; OLIVER, C.N. (1989): Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. Arch. Biochem. Biophys. **275**: 559-567

STONE, W.L.; DRATZ, E.A. (1980): Increased glutathione-S-transferase activity in antioxidant-deficient rats. Biochim. Biophys. Acta **631**: 503-506

SU, D.; NOVOSELOV, S.V.; SUN, Q.-A.; MOUSTAFA, M.E.; ZHOU, Y.; OKO, R.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V.N. (2005): Mammalian selenoprotein thioredoxin/glutathione reductase: Roles in disulfide bond formation and sperm maturation. J. Biol. Chem. **280**: 26491-26498

SUN, Q.-A.; KIRNARSKY, L.; SHERMAN, S.; GLADYSHEV, V.N. (2001): Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. PNAS **98**: 3673-3678

SUN, X.; MORIARTY, P.M.; MAQUAT, L.E. (2000): Nonsense-mediated decay of glutathione peroxidise-1 mRNA in the cytoplasm depends on intron position. EMBO J. **19**: 4734-4744

SUNDE, R.A. (1990): Molecular biology of selenoproteins. Ann. Rev. Nutr. **10**: 451-474

SUNDE, R.A. (2001): Regulation of selenoprotein expression. In: Hatfield (ed.) Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health. Klüwer Academic Press, Norwood

SUNDE, R.A.; DYER, J.A.; MORAN, T.V.; EVENSON, J.; SUGIMOTO, M. (1993): Phospholipid hydroperoxide glutathionperoxidase: Full-length pig blastocyst cDNA sequence and regulation by selenium status. Biochem. Biophys. Res. Comm. **193**: 905-911

SUZUKI, K.T.; ITOH, M. (1997): Metabolism of selenite labelled with enriched stable isotope in the bloodstream. J. Chromato. B. **692**: 15-22

SUZUKI, K.T.; KURASAKI, K.; OKAZAKI, N.; OGRA, Y. (2005): Selenosugar and trimethylselenonium among urinary Se metabolites: Dose- and age-related changes. Toxicol. Appl. Pharmacol. **206**: 1-8

SUZUKI, K.T.; OHTA, Y.; SUZUKI, N. (2006): Availability and metabolism of 77Se-methylseleninic acid compared simultaneously with those of three related selenocompounds. Toxicol. Appl. Pharmacol. **217**: 51-62

SUZUKI, K.T.; SHIOBARA, Y.; ITOH, M.; OHMICHI, M. (1998): Selective uptake of selenite by red blood cells. Analyst **123**: 63-67

TAKAHASHI, K.; AVISSAR, N.; WHITIN, J.; COHEN, H. (1987): Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase:a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. Arch. Biochem. Biophys. **256**: 677-686

TAMURA, T.; STADTMAN, T.C. (1996): A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: Purification, properties, and thioredoxin reductase activity. PNAS **93**: 1006-1011

TANAKA, K.; HASHIMOTO, T.; TOKUMARU, S.; IGUCHI, H.; KOJO, S. (1997): Interactions between vitamin C and vitamin E are observed in tissues of inherently scorbutic rats. J. Nutr. **127**: 2060-2064

TANG, R.; LIU, H.; WANG, T.; HUANG, K. (2005): Mechanisms of selenium inhibition of cell apoptosis induced by oxysterols in rat vascular smooth muscle cells. Arch. Biochem. Biophys. **441**: 16-24

THIETZE, F. (1969): Enzymic method for quanitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione and other tissues. Anal. Biochem. **27**: 502-522

t´ HOEN, P.A.C.; ROOSEBOOM, M.; BIJSTERBOSCH, M.K.; van BERKEL, T.J.C.; VERMEULEN, N.P.E.; COMMANDEUR, J.N.M. (2002): Induction of glutathione-S-transferase mRNA levels by chemopreventive selenocysteine Se-conjugates. Biochem. Pharmacol. **63**: 1843-1849

THOMAS, J.P.; MAIORINO, M.; URSINI, F.; GIROTTI, A. (1990): Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. J. Biol. Chem. **265**: 454-461

THOMPSON, K.M.; HAIBACH, H.; EVENSON, J.K.; SUNDE, R.A. (1998): Liver selenium and testis phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidise are associated with growth during selenium repletion of second-generation Se-deficient male rats. J. Nutr. **128**: 1289-1295

THOMPSON, K.M.; HAIBACH, H.; SUNDE, R.A. (1995): Growth and plasma triiodothyronine concentration are modified by selenium deficiency and repletion in second-generation selenium-deficient rats. J. Nutr. **125**: 864-873

THORLACIUS-USSING, O. (1990): Selenium-induced growth retardation. Dan. Med. Bull. **37**: 347-358

THORLACIUS-USSING, O.; FLYVBJERG, A.; ESMANN, J. (1987): Evidence that selenium induces growth retardation through reduced growth hormone and somatomedin C production. Endocrin. **120**: 659-663

TREVAN, J.W. (1927): The error of determination of toxicity. Proc. Royal Soc. (London) Series B **101**: 483-514

TUJEBAJEVA, R.M.; COPELAND, P.R.; XU, X-M.; CARLSON, B.A.; HARNEY, J.W.; DRISCOLL, D.M.; HATFIELD, D.L.; BERRY, M.L. (2000): Decoding appartus for eukaryotic selenocysteine insertion. EMBO Rep. **1**: 158-163

TURNER, J.C.; OSBORN, P.J.; McVEAGH, S.M. (1990): Studies on selenate and selenite absorption by sheep ileum using everted sac method and an isolated, vascularly perfused system. Comp. Biochem. Physiol. **95A**: 297-301

TURUNEN, N.; KARIHTALA, P.; MÄNTYNIEMI, A.; SORMUNEN, R.; HOLMGREN, A.; KINNULA, V.L.; SOINI, Y. (2004): Thioredoxin is associated with proliferation, p 53 expression and negative estrogen and progesterone receptor status in breast carcinoma. APMIS **112**: 123-132

ULLREY, D.E. (1987): Biochemical and physiological indicators of selenium status in animals. J. Anim. Sci. **65**: 1712-1726

URSINI, F.; HEIM, S.; KIESS, M.; MAIORINO, M.; ROVERI, A.; WISSING, J.; FLOHÉ, L. (1999): Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. Science. **285**: 1393-1396

URSINI, F.; MAIORINO, M.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; AUMANN, K.D.; ROVERI, A.; SCHOMBURG, D. and FLOHÉ, L**.** (1995): The diversity of glutathione peroxidases. Methods Enzymol. **252**: 38-53

URSINI, F.; MAIORINO, M.; GREGOLIN, C. (1985): The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Biochim. Biophys. Acta **839**: 62-70

USAMI, M.; TABATA, H.; OHNO, Y. (1999): Effects of glutathione depletion on selenite- and selenate-induced embryotoxicity in cultured rat embryos. Tert. Carci. Mutag. **19**: 257-266

VAN DE WEERDT, B.C.M.; MEDEMA, R.H. (2006): Polo-Like Kinases. A team in control of the division. Cell Cycle **5**: 853-864

VAN KAMPEN, K.R.; JAMES, L.F. (1978) Manifestation of intoxication by selenium-accumulating plants. In: Van Kampen and James (eds.) Effects of poisonous plants on livestock. Acad. Press Inc., New York

VEEGER, C.; DER VARTARIAN, D.V.; ZEYLEMAKER, W.P. (1969): Succinate Dehydrogenase. Methods Enzymol. **13**: 81-90

VENDELAND, S.C.; BUTLER, J.A.; WHANGER, P.D. (1992a): Intestinal absorption of selenite, selenate, and selenomethionine in the rat. J. Nutr. Biochem. **3**: 359-365

VENDELAND, S.C.; DEAGAN, J.T.; WHANGER, P.D. (1992b): Uptake of selenotrisulfides of glutathione and cysteine by brush border membranes from rat intestines. J. Inorg. Biochem. **47**: 131-140

WASCHULEWSKI, I.H.; SUNDE, R.A. (1988): Effect of dietary methionine on tissue selenium and glutathione peroxidase activity in rats given selenomethionine. Br. J. Nutr. **60**: 57-68

WATERS, D.J.; SHEN, S.; GLICKMAN, L.T.; COOLEY, D.M.; BOSTWICK, D.G.; Qian, J.; COMBS, G.F. Jr.; MORRIS, J.S. (2005): Prostate cancer rist and DNA damage: translational significance of selenium supplementation in a canine model. Carcinogenesis **26**: 1256-1262

WEISS, J.R.; MOYSICH, K.B.; SWEDE, H. (2005): Epidemiology of male breast cancer. Canc. Epidemiol. **14**: 20-26

WEISS, S.L.; EVENSON, J.K.; THOMPSON, K.M.; SUNDE, R.A. (1996): The selenium requirement for glutathione peroxidase mRNA level is half of the selenium requirement for glutathione peroxidase activity in female rats. J Nutr. **126**: 2260-7

WEISS SACHDEV, S.; SUNDE, R.A. (2001): Selenium regulation of transcript abundance and translational efficiency of glutathione peroxidise-1 and -4 in liver. Biochem. J. **357**: 851-858

WEN, W.; WEISS, S.L.; SUNDE, R.A. (1998): UGA codon position affects the efficiency of selenocysteine incorporation into glutathione peroxidase-1. J Biol Chem. **273**: 28533-28541

WEITZEL, F.; URSINI, F.; WENDEL, A. (1990): Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in various mouse organs during selenium deficiency and repletion. Biochem. Biophys. Acta. **1036**: 88-94

WELZ, B.; MELCHER, M.; SCHLEMMER, G. (1983): Determination of selenium in human blood serum. Comparison of two atomic-absorption spectrometric procedures. Fresenius Z. Anal. Chem. **316**: 271-276

WILBER, C.G. (1980): Toxicology of selenium: A review. Clin. Toxicol. **17**: 171-230

WILKENSON, K.D. (2000): Ubiquitination and deubiquitination: Targeting of proteins for degradation by the proteasome. Cell Dev. Biol. **11**: 141-148

WINGLER, K.; BÖCHER, M.; FLOHÉ, L.; KOLLMUS, H.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R. (1999): mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoprotein. Eur. J. Biochem. **259**: 149-157

WHANGER, P.D.; BEILSTEIN, M.A.; THOMSON, C.D.; ROBINSON, M.F.; HOWE, M. (1988): Blood selenium and glutathione peroxidise activity of populations in New Zealand, Oregon and South Dakota. FASEB J. **2**: 2996-3002

WHANGER, P.D.; BUTLER, J. A. (1988): Effects of various dietary levels of selenium as selenite or selenomethionine on tissue selenium levels and glutathione peroxidase activity in rats. J. Nutr. **118**: 846-852

WHITIN, J.C.; BHAMBRE, S.; THAM, D.M.; COHEN, H.J. (2002): Extracellular glutathione peroxidise is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells. Am. J. Physiol. Renal Physiol. **283**: F20-F28

WOLFFRAM, S. (2000): Metabolism of nutritionally relevant inorganic and organic forms of selenium. Übers. Tierernährung **28**: 65-94

WOLFFRAM, S.; ANLIKER, E.; SCHARRER, E. (1986): Uptake of selenate and slenite by isolated brush border membrane vesicles from pig, sheep and rat intestine. Biol. Trace Elem. Res. **10**: 293-306

WOLFFRAM, S.; ARDUESER, F.; SCHARRER, E. (1985): In vivo absorption of selenate and selenite by rats. J. Nutr. **115**: 454-459

WOLFFRAM, S.; BERGER, B.; GRENACHER, B.; SCHARRER, E. (1989): Transport of selenoamino acids and their sulfur analogues across the intestinal brush border membrane of pigs. J. Nutr. **119**: 706-712

WOLFFRAM, S.; GRENACHER, B.; SCHARRER, E. (1988): Transport of selenate and sulphate across the intestinal brush border membrane of pig jejunum by two common mechanisms. Quart. J. Exp. Physiol. **73**: 103-111

WU, D.; CEDERBAUM, A.I. (2003): Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. Alcohol Research and Health **27**: 277-284

WU, S.H.; OLDFIELD, J.E.; WHANGER, P.D.; WESWIG, P.H. (1973): Effect of selenium, vitamin E, and antioxidants on testicular function in rats. Biol. Reprod. **8**: 625-629

WUERMLI, R.; WOLFFRAM, S.; STINGLEIN, Y.; SCHARRER, E. (1989): Stimulation of mucosal uptake of selenium from selenite by L-cysteine in sheep small intestine. Biol. Trace Elem. Res. **20**: 75-85

WYCHERLY, B.J.; MOAK, M.A.; CHRISTENSEN, M.J. (2004): High dietary intake of sodium selenite induces oxidative DNA damage in rat liver. Nutr. Canc. **48**: 78-83

XIA, Y.; HILL, K.E.; BURK, R.F. (1985): Effect of selenium deficiency on hydroperoxide-induced glutathione release from the isolated perfused rat heart. J. Nutr. **115**: 733-742

XU, X.-M.; MIX, H.; CARLSON, B.A.; GRABOWSKI, P.J.; GLADYSHEV, V.N.; BERRY, M.J.; HATFIELD, D.L. (2005): Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble liver antigen, in the selenoprotein synthesis machinery. J. Biol. Chem. **280**: 41568-41575

YAMAMOTO, Y.; NAGATA, Y.; NIKI, E.; WATANABE, K.; YOSHIMURA, S. (1993): Plasma glutathione peroxidase reduces phoshatidylcholine hydroperoxide. Biochem. Biophys. Res. Comm., **193**: 133-138

YAN, L.; SPALLHOLZ, J.E. (1993): Generation of reactive oxygen species from the reaction of selenium compounds with thiols and mammary tumor cells. Biochem. Pharmacol. **45**: 429-437

YANG, Y.; CHENG, J.-Z.; SINGHAL, S.S.; SAINI, M.; PANDYA, U.; AWASTHI, S.; AWASTHI, Y. (2001): Role of glutathione-S-transferase in protection against lipid peroxidation. J. Biol. Chem. **276**: 19220-19230

YEH, J.-Y.; VENDELAND, S.C.; GU, Q.-P.; BUTLER, J.A.; OU, B.-R.; WHANGER, P.D. (1997): Dietary selenium increases selenoprotein W levels in rat tissue. J. Nutr. **127**: 2165-2172

YOON, S.-O.; KIM, M.-M.; PARK, S.-J.; KIM, D.; CHUNG, J.; CHUNG, A.-S. (2002): Selenite suppresses hydrogen peroxide-induced cell apoptosis through inhibition of ASK1/JNK and activation of PI3-K/Akt pathways. FASEB **16**: 111-113

YOSHIMURA, S.; WATANABE, K.; SUEMIZU, H.; ONOZAWA, T.; MIZOGUSHI, J.; TSUDA, K.; HATTA, H.; MORIUCHI, T. (1991): Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney. J. Biochem. **109**: 918-923

ZHAO, T.; SINGHAL, S.S.; PIPER, J.T.; CHENG, J.; PANDYA, U.; CLARK-WRONSKI, J.; AWASTHI, S.; AWASTHI, Y.C. (1999): The role of human glutathione-S-transferase hGSTA1-1 and hGSTA2-2 in protection against oxidative stress. Arch. Biochem. Biophys. **367**: 216-244

ZHOU, B.-B. S.; ELLEDGE, S.J. (2000): The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. Nature **408**: 433-439

ZUBERBUEHLER, C.A.; MESSIKOMMER, R.E.; WENK, C. (2002): Choice feeding of selenium-deficient laying hens affect diet selection, selenium intake and body weight. J. Nutr. **132**: 3411-3417

ZUO, L.; CHRISTOFI, F.L.; WRIGHT, V.P.; BAO, S.; CLANTON, T.L. (2004): Lipoxygenase-dependent superoxide release in skeletal muscle. J. Appl. Physiol. **97**: 661-668

# 10 Anhang

***Tabelle A1a:*** *Wöchentliche Futteraufnahme, Gesamtfutteraufnahme, Futterverwertung in Versuch 1*

| Versuch 1 | | Wöchentliche Futteraufnahme (g) | | | | | | | | $FA_G$ (g) | FV (g/g) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe/Tier | | $d_{1-7}$ | $d_{8-14}$ | $d_{15-21}$ | $d_{22-28}$ | $d_{29-35}$ | $d_{36-42}$ | $d_{43-49}$ | $d_{50-56}$ | $d_{1-56}$ | |
| | 01 | 107,3 | 141,7 | 163,2 | 167,7 | 171,3 | 212,3 | 124,3 | 161,7 | 1249 | 4,77 |
| | 02 | 95,6 | 129,2 | 134,7 | 133,6 | 148,7 | 159,8 | 85,56 | 124,9 | 1012 | 5,47 |
| | 03 | 103,6 | 127,3 | 123,4 | 137,6 | 147,7 | 168,4 | 89,21 | 138,8 | 1036 | 4,88 |
| | 04 | 101,0 | 138,1 | 144,4 | 143,4 | 152,5 | 204,8 | 109,5 | 151,4 | 1145 | 5,00 |
| 0 | 05 | 105,9 | 132,5 | 145,8 | 144,8 | 149,6 | 202,0 | 107,5 | 148,8 | 1137 | 5,62 |
| | 06 | 104,3 | 139,1 | 156,2 | 163,0 | 168,8 | 205,8 | 110,0 | 136,4 | 1183 | 5,30 |
| | 07 | 116,2 | 139,2 | 146,1 | 151,9 | 166,2 | 218,2 | 130,6 | 153,8 | 1222 | 4,33 |
| | 08 | 119,2 | 142,2 | 167,9 | 156,1 | 146,7 | 189,6 | 103,5 | 152,1 | 1177 | 5,44 |
| | 09 | 125,3 | 159,6 | 177,8 | 176,0 | 177,3 | 223,1 | 111,7 | 167,5 | 1318 | 5,43 |
| | M<br>SD | 108,7<br>9,54 | 138,8<br>9,47 | 151,0<br>16,96 | 152,7<br>14,25 | 157,8<br>11,99 | 198,2<br>21,73 | 108,0<br>14,45 | 148,4<br>13,15 | 1165<br>97,25 | 5,10 |
| | 11 | 119,3 | 150,4 | 171,7 | 185,4 | 175,3 | 203,3 | 105,9 | 128,3 | 1239 | 5,21 |
| | 12 | 96,71 | *105,5* | 121,0 | 129,6 | 135,0 | 191,8 | 100,3 | 119,4 | 999,3 | 4,77 |
| | 13 | 120,7 | 143,5 | 166,5 | 174,0 | 178,9 | 217,8 | 117,2 | 120,1 | 1239 | 5,45 |
| | 14 | 115,1 | 146,6 | 158,4 | 166,0 | 164,3 | 199,4 | 115,9 | 149,4 | 1215 | 5,12 |
| I | 15 | 90,02 | 135,0 | 144,9 | 152,9 | 160,6 | 210,4 | 107,3 | 132,0 | 1133 | 4,79 |
| | 16 | 136,02 | 130,8 | 133,3 | 189,3 | 180,9 | 220,7 | 121,3 | 142,0 | 1254 | 5,52 |
| | 17 | 114,48 | 133,9 | 158,5 | 172,1 | 161,1 | 208,4 | 115,1 | 129,4 | 1193 | 4,78 |
| | 18 | 118,19 | 149,9 | 161,8 | 163,2 | 170,8 | 186,8 | 98,6 | 119,5 | 1169 | 5,27 |
| | 19 | 105,41 | 137,2 | 162,9 | 169,2 | 170,8 | 217,9 | 121,2 | 151,5 | 1236 | 4,54 |
| | M<br>SD | 112,9<br>13,76 | 140,9<br>7,66 | 153,2<br>16,77 | 151,2<br>17,78 | 165,2<br>13,86 | 206,3<br>11,94 | 132,4<br>8,63 | 131,5<br>12,52 | 1186<br>80,38 | 5,04 |
| | 21 | 86,95 | 125,1 | 154,6 | 154,3 | 132,8 | 181,1 | 111,0 | 130,6 | 1076 | 5,03 |
| | 22 | 95,75 | 118,0 | 147,6 | 150,6 | 143,0 | 208,0 | 108,1 | 130,8 | 1102 | 4,91 |
| | 23 | 108,07 | 135,8 | 149,0 | 160,5 | 161,2 | 198,7 | 110,3 | 131,3 | 1155 | 5,46 |
| | 24 | 97,64 | 129,7 | 132,7 | 141,8 | 149,2 | 175,6 | 112,8 | 122,1 | 1062 | 5,31 |
| II | 25 | 124,43 | 153,7 | 171,6 | 177,5 | 179,0 | 232,0 | 107,6 | 136,0 | 1282 | *5,66* |
| | 26 | 92,24 | 109,2 | 141,1 | 133,7 | 141,9 | 178,5 | 94,53 | 118,8 | 1010 | *5,89* |
| | 27 | 99,60 | 135,3 | 151,1 | 143,0 | 152,1 | 183,7 | 97,86 | 120,0 | 1083 | 5,15 |
| | 28 | 97,20 | 128,8 | 137,3 | 139,9 | 142,2 | 196,5 | 95,69 | 132,8 | 1070 | 5,52 |
| | 29 | 95,31 | 118,8 | 136,9 | 146,1 | 165,5 | 205,4 | 117,3 | 135,1 | 1121 | 4,36 |
| | M<br>SD | 99,69<br>10,87 | 125,1<br>9,20 | 146,9<br>11,84 | 150,9<br>13,15 | 151,3<br>14,36 | 195,5<br>18,13 | 128,6<br>8,12 | 127,1<br>6,56 | 1107<br>76,99 | 5,08 |

***Tabelle A1b:*** *Wöchentliche Futteraufnahme, Gesamtfutteraufnahme, Futterverwertung in Versuch 1*

| Versuch 1 | | Wöchentliche Futteraufnahme (g) | | | | | | | | $FA_G$ (g) | FV (g/g) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | Tier | $d_{1-7}$ | $d_{8-14}$ | $d_{15-21}$ | $d_{22-28}$ | $d_{29-35}$ | $d_{36-42}$ | $d_{43-49}$ | $d_{50-56}$ | $d_{1-56}$ | |
| | 31 | 87,73 | 97,47 | 131,0 | 136,1 | 153,0 | 197,2 | 97,97 | 119,1 | 1020 | 5,31 |
| | 32 | 99,65 | 132,6 | 149,9 | 152,9 | 160,8 | 198,2 | 104,1 | 121,7 | 1120 | 5,44 |
| | 33 | 101,4 | 129,4 | 153,6 | 155,3 | 153,9 | 202,0 | 115,4 | 139,1 | 1150 | 4,64 |
| | 34 | 88,32 | 107,5 | 110,2 | 124,7 | 133,3 | 169,8 | 93,25 | 119,2 | 945,9 | 5,09 |
| III | 35 | 89,39 | 117,9 | 135,6 | 132,2 | 151,0 | 191,4 | 99,13 | 128,5 | 1045 | 4,71 |
| | 36 | 96,07 | 122,9 | 130,5 | 145,3 | 158,2 | 199,6 | 114,2 | 134,1 | 1101 | 4,50 |
| | 37 | 102,6 | 125,4 | 145,5 | 141,4 | 150,7 | 159,7 | 75,01 | 113,3 | 1014 | 5,42 |
| | 38 | 95,30 | 131,3 | 152,2 | 159,8 | 162,8 | 213,4 | 114,2 | 135,4 | 1164 | 4,53 |
| | 39 | 88,32 | 119,8 | 149,2 | 148,4 | 165,0 | 207,5 | 122,3 | 143,0 | 1144 | 4,69 |
| | M | 94,34 | 120,5 | 139,8 | 153,2 | 151,6 | 193,2 | 104,0 | 125,0 | 1078 | 4,89 |
| | SD | 6,07 | 11,62 | 14,26 | 11,56 | 9,42 | 17,47 | 14,53 | 10,32 | 75,27 | |
| | 41 | 98,43 | 122,2 | 140,4 | 146,8 | 158,3 | 189,3 | 102,7 | 122,0 | 1081 | 4,71 |
| | 42 | 103,0 | 113,5 | 138,2 | 148,9 | 155,4 | 204,6 | 111,0 | 135,0 | 1110 | 4,77 |
| | 43 | 102,4 | 124,8 | 141,9 | 132,5 | 149,3 | 194,9 | 102,6 | 120,9 | 1069 | 4,77 |
| | 44 | 97,58 | 116,3 | 134,3 | 147,2 | 158,2 | 174,5 | 112,0 | 153,5 | 1094 | 5,01 |
| IV | 45 | 105,0 | 132,85 | 151,6 | 135,5 | 149,7 | 176,2 | 111,7 | 144,3 | 1108 | 5,42 |
| | 46 | 100,8 | 122,5 | 142,5 | 148,4 | 153,9 | 190,4 | 108,2 | 108,8 | 1075 | 4,81 |
| | 47 | 105,9 | 119,3 | 140,5 | 139,2 | 141,4 | 183,3 | 110,3 | 133,7 | 1074 | 5,22 |
| | 48 | 96,61 | 122,58 | 143,3 | 149,1 | 165,7 | 198,5 | 113,5 | 132,3 | 1122 | 4,97 |
| | 49 | 94,59 | 117,3 | 146,6 | 147,2 | 143,3 | 181,3 | 90,12 | 113,7 | 1034 | 5,46 |
| | M | 100,4 | 121,3 | 142,2 | 157,6 | 152,3 | 188,1 | 106,9 | 131,2 | 1085 | 5,00 |
| | SD | 3,93 | 5,64 | 4,90 | 6,23 | 7,72 | 10,18 | 7,42 | 14,39 | 26,50 | |
| | 51 | 109,7 | 127,0 | 148,4 | 160,7 | 167,5 | 196,4 | 103,0 | 156,3 | 1170 | 5,06 |
| | 52 | 98,27 | 126,3 | 152,9 | 163,8 | 178,7 | 214,6 | 130,2 | 148,1 | 1213 | 4,73 |
| | 53 | 103,46 | 131,0 | 147,8 | 159,9 | 161,0 | 210,5 | 78,07 | 150,0 | 1142 | 4,75 |
| V | 54 | 113,0 | 117,3 | 140,5 | 150,3 | 151,7 | 202,6 | 97,52 | 160,7 | 1134 | 4,85 |
| | 55 | 90,42 | 91,33 | 112,2 | 123,3 | 125,2 | 174,7 | 149,2 | 123,1 | 989,4 | 5,43 |
| | 56 | 109,94 | 120,0 | 164,7 | 173,3 | 158,9 | 192,2 | 125,7 | 156,2 | 1201 | 5,34 |
| | 57 | 123,29 | 146,9 | 178,9 | 177,0 | 184,7 | 238,4 | 121,6 | 149,0 | 1320 | 5,40 |
| | 58 | 103,22 | 117,4 | 143,5 | 159,0 | 154,7 | 198,8 | 115,7 | 145,1 | 1137 | 5,30 |
| | 59 | 100,8 | 122,6 | 138,8 | 163,0 | 165,8 | 199,6 | 112,5 | 138,6 | 1142 | 4,92 |
| | M | 105,8 | 122,2 | 147,5 | 157,9 | 161,1 | 203,1 | 114,8 | 149,0 | 1161 | 5,07 |
| | SD | 9,49 | 14,71 | 18,37 | 15,48 | 17,13 | 17,45 | 20,54 | 11,27 | 87,34 | |

***Tabelle A1c:*** *Wöchentliche Futteraufnahme, Gesamtfutteraufnahme, Futterverwertung in Versuch 1*

| Versuch 1 | | Wöchentliche Futteraufnahme (g) | | | | | | | | $FA_G$ (g) | FV (g/g) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe/Tier | | $d_{1-7}$ | $d_{8-14}$ | $d_{15-21}$ | $d_{22-28}$ | $d_{29-35}$ | $d_{36-42}$ | $d_{43-49}$ | $d_{50-56}$ | $d_{1-56}$ | |
| | 61 | 108,7 | 120,9 | 138,9 | 150,6 | 144,2 | 171,7 | 110,0 | 151,6 | 1097 | 4,68 |
| | 62 | 123,9 | 144,0 | 175,4 | 179,2 | 174,8 | 213,1 | 111,0 | 156,9 | 1278 | 5,04 |
| | 63 | 116,7 | 120,5 | 155,3 | 147,7 | 145,5 | 180,2 | 103,4 | 135,9 | 1105 | 5,36 |
| | 64 | 108,1 | 128,0 | 168,5 | 183,0 | 186,5 | 237,0 | 137,3 | 105,4 | 1254 | 4,38 |
| VI | 65 | 96,7 | 108,3 | 138,6 | 141,6 | 139,6 | 209,9 | 96,18 | 139,9 | 1071 | 5,32 |
| | 66 | 87,15 | 96,18 | 107,6 | 131,8 | 143,5 | 200,1 | 117,1 | 140,0 | 1024 | 4,71 |
| | 67 | 105,7 | 132,7 | 150,7 | 168,9 | 164,9 | 212,2 | 123,3 | 144,1 | 1202 | 4,79 |
| | 68 | 109,4 | 123,1 | 149,9 | 142,3 | 154,1 | 190,3 | 99,94 | 114,7 | 1084 | 5,30 |
| | 69 | 105,7 | 131,5 | 163,1 | 170,9 | 184,1 | 200,2 | 103,6 | 151,3 | 1210 | 4,83 |
| | M | 107,0 | 122,8 | 149,8 | 170,9 | 157,0 | 201,6 | 111,3 | 139,1 | 1148 | 4,91 |
| | SD | 10,47 | 14,03 | 20,11 | 18,45 | 18,39 | 19,55 | 12,94 | 17,24 | 90,17 | |

***Tabelle A2a:*** *Wöchentliche Lebendmasseentwicklung, Gesamtlebendmasse-zunahmen, tägliche Zunahmen in Versuch 1*

| Versuch 1 | | Lebendmasseentwicklung (g) | | | | | | | | $LMZ_G$ (g) | TZ (g/d) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | Tier | $d_{1-7}$ | $d_{8-14}$ | $d_{15-21}$ | $d_{22-28}$ | $d_{29-35}$ | $d_{36-42}$ | $d_{43-49}$ | $d_{50-56}$ | $d_{1-56}$ | |
| | 01 | 98,30 | 141,8 | 186,2 | 226,3 | 254,8 | 286,1 | 296,8 | 319,2 | 261,7 | 4,67 |
| | 02 | 92,90 | 136,4 | 168,5 | 194,6 | 220,2 | 231,5 | 236,2 | 245,8 | 184,9 | 3,30 |
| | 03 | 101,4 | 140,3 | 174,4 | 205,3 | 229,6 | 248,5 | 259,2 | 273,8 | 212,4 | 3,79 |
| | 04 | 97,90 | 144,6 | 183,1 | 216,1 | 242,8 | 270,9 | 275,8 | 292,3 | 228,9 | 4,09 |
| 0 | 05 | 101,4 | 144,6 | 182,9 | 207,7 | 230,3 | 254,2 | 258,3 | 266,1 | 202,3 | 3,61 |
| | 06 | 105,4 | 148,8 | 192,5 | 226,4 | 255,1 | 279,8 | 275,8 | 289,9 | 223,1 | 3,98 |
| | 07 | 109,7 | 151,9 | 189,4 | 227,2 | 259,1 | 303,6 | 321,9 | 349,0 | 282,0 | 5,04 |
| | 08 | 111,7 | 152,3 | 199,7 | 221,3 | 240,6 | 261,1 | 267,5 | 284,9 | 216,4 | 3,86 |
| | 09 | 95,60 | 138,7 | 181,7 | 216,5 | 241,3 | 271,2 | 279,8 | 299,3 | 242,8 | 4,34 |
| | M | 101,6 | 144,4 | 184,3 | 215,7 | 241,5 | 267,4 | 274,6 | 291,1 | 228,8 | 4,08 |
| | SD | 5,95 | 5,36 | 8,77 | 10,59 | 12,45 | 20,28 | 23,06 | 30,06 | | |
| | 11 | 93,00 | 133,9 | 179,7 | 218,8 | 244,6 | 273,5 | 280,3 | 295,6 | 237,8 | 4,25 |
| | 12 | 87,80 | *111,0* | 137,7 | *166,6* | *191,4* | 233,6 | 248,0 | 270,1 | 209,7 | 3,74 |
| | 13 | 99,10 | 137,4 | 179,0 | 217,2 | 242,1 | 274,4 | 283,1 | 288,9 | 227,1 | 4,06 |
| | 14 | 106,1 | 149,4 | 192,7 | 223,6 | 249,9 | 276,6 | 284,4 | 300,8 | 237,5 | 4,24 |
| I | 15 | 100,5 | 152,1 | 183,4 | 226,3 | 256,6 | 284,7 | 288,9 | 300,5 | 236,6 | 4,23 |
| | 16 | 102,6 | *114,2* | 149,1 | 197,6 | 232,2 | 261,9 | 277,4 | 293,9 | 227,1 | 4,06 |
| | 17 | 106,7 | 151,0 | 194,0 | 235,7 | 260,5 | 296,1 | 307,2 | 317,0 | 249,8 | 4,46 |
| | 18 | 111,4 | 153,8 | 191,1 | 227,7 | 255,8 | 279,2 | 280,6 | 290,1 | 221,7 | 3,96 |
| | 19 | 94,20 | 137,0 | 183,4 | 222,9 | 257,1 | 291,4 | 308,2 | 328,5 | 272,5 | 4,87 |
| | M | 100,2 | 144,9 | 176,7 | 221,2 | 249,9 | 274,6 | 284,2 | 298,4 | 235,5 | 4,21 |
| | SD | 7,08 | 7,82 | 18,71 | 10,40 | 8,99 | 17,37 | 16,71 | 16,77 | | |
| | 21 | 80,50 | 124,7 | 169,6 | 197,4 | 209,0 | 237,5 | 251,3 | 271,9 | 213,9 | 3,82 |
| | 22 | 92,40 | 125,4 | 170,7 | 207,5 | 228,1 | 263,5 | 272,2 | 284,4 | 224,2 | 4,00 |
| | 23 | 93,20 | 133,1 | 168,1 | 205,7 | 231,9 | 251,5 | 263,6 | 273,5 | 211,6 | 3,78 |
| | 24 | 94,70 | 134,0 | 166,7 | 199,9 | 225,8 | 245,7 | 256,8 | 263,3 | 200,0 | 3,57 |
| II | 25 | 100,7 | 142,6 | 183,4 | 220,8 | 243,6 | 271,2 | 281,3 | 290,6 | 226,6 | 4,05 |
| | 26 | 93,30 | 122,9 | 159,9 | *181,4* | 198,6 | 222,6 | 227,3 | 237,8 | 171,6 | 3,06 |
| | 27 | 100,4 | 144,2 | 185,9 | 214,7 | 240,1 | 262,8 | 267,3 | 277,5 | 210,2 | 3,75 |
| | 28 | 99,10 | 140,1 | 173,2 | 199,0 | 216,9 | 244,2 | 252,4 | 262,1 | 193,9 | 3,46 |
| | 29 | 90,60 | 133,8 | 173,7 | 214,7 | 253,2 | 289,1 | 302,5 | 312,6 | 256,8 | 4,59 |
| | M | 93,88 | 133,4 | 172,4 | 207,5 | 227,5 | 254,2 | 263,9 | 274,9 | 212,1 | 3,79 |
| | SD | 5,87 | 7,43 | 7,63 | 8,03 | 16,30 | 18,63 | 19,87 | 20,77 | | |

***Tabelle A2b:*** *Wöchentliche Lebendmasseentwicklung, Gesamtlebendmasse-zunahmen, tägliche Zunahmen in Versuch 1*

| Versuch 1 | | Lebendmasseentwicklung (g) | | | | | | | | $LMZ_G$ (g) | TZ (g/d) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | Tier | $d_{1-7}$ | $d_{8-14}$ | $d_{15-21}$ | $d_{22-28}$ | $d_{29-35}$ | $d_{36-42}$ | $d_{43-49}$ | $d_{50-56}$ | $d_{1-56}$ | |
| | 31 | 84,90 | 109,7 | 146,8 | 180,2 | 205,7 | 235,0 | 239,9 | 250,2 | 191,9 | 3,43 |
| | 32 | 78,20 | 113,9 | 151,8 | 181,4 | 206,2 | 234,7 | 248,5 | 266,1 | 206,0 | 3,68 |
| | 33 | 101,6 | 146,6 | 192,2 | 226,4 | 251,8 | 281,2 | 289,4 | 309,6 | 247,7 | 4,42 |
| | 34 | 92,50 | 118,8 | 148,4 | 178,6 | 205,2 | 235,4 | 241,7 | 249,1 | 186,0 | 3,32 |
| III | 35 | 97,70 | 134,9 | 171,1 | 205,0 | 232,4 | 257,9 | 271,0 | 286,0 | 221,8 | 3,96 |
| | 36 | 96,10 | 133,8 | 170,5 | 211,9 | 244,0 | 283,5 | 295,3 | 311,0 | 244,8 | 4,37 |
| | 37 | 98,40 | 140,9 | 175,1 | 200,8 | 225,4 | 228,9 | 230,0 | 254,3 | 187,0 | 3,34 |
| | 38 | 99,30 | 141,8 | 189,9 | 229,7 | 260,4 | 293,3 | 306,4 | 324,9 | 256,0 | 4,59 |
| | 39 | 87,30 | 126,0 | 169,9 | 204,0 | 236,0 | 262,1 | 278,0 | 299,6 | 243,8 | 4,35 |
| | M | 92,89 | 129,6 | 168,4 | 202,0 | 229,7 | 256,9 | 266,7 | 283,4 | 220,7 | 3,94 |
| | SD | 7,39 | 12,40 | 15,74 | 18,02 | 19,52 | 23,26 | 26,00 | 29,29 | | |
| | 41 | 94,00 | 134,6 | 177,5 | 210,2 | 241,7 | 267,7 | 275,9 | 287,9 | 229,2 | 4,09 |
| | 42 | 81,60 | 109,2 | 143,2 | 179,0 | 208,7 | 243,9 | 265,9 | 292,7 | 232,6 | 4,15 |
| | 43 | 100,7 | 139,7 | 178,4 | 207,3 | 233,4 | 263,7 | 270,0 | 286,2 | 224,2 | 4,00 |
| | 44 | 97,00 | 134,2 | 170,8 | 210,9 | 238,2 | 256,1 | 268,8 | 281,1 | 218,1 | 3,89 |
| IV | 45 | 104,6 | 146,9 | 183,5 | 206,1 | 229,0 | 252,0 | 261,3 | 268,6 | 204,1 | 3,65 |
| | 46 | 98,70 | 136,1 | 177,1 | 208,3 | 234,5 | 260,5 | 269,6 | 289,4 | 223,5 | 3,99 |
| | 47 | 104,1 | 141,4 | 180,0 | 207,3 | 223,7 | 247,8 | 260,1 | 273,2 | 205,7 | 3,67 |
| | 48 | 94,60 | 131,9 | 172,5 | 197,6 | 241,1 | 268,5 | 280,1 | 293,8 | 225,9 | 4,03 |
| | 49 | 86,00 | 124,5 | 163,1 | 194,6 | 218,9 | 242,8 | 241,0 | 245,1 | 189,4 | 3,38 |
| | M | 95,70 | 133,2 | 171,8 | 202,4 | 229,1 | 255,9 | 265,9 | 279,8 | 217,0 | 3,87 |
| | SD | 7,32 | 10,34 | 11,56 | 9,78 | 10,42 | 9,29 | 10,62 | 15,56 | | |
| | 51 | 99,70 | 138,9 | 180,4 | 222,7 | 249,5 | 270,0 | 275,8 | 289,9 | 231,2 | 4,13 |
| | 52 | 90,20 | 129,4 | 172,3 | 215,3 | 250,7 | 281,1 | 299,1 | 316,6 | 256,6 | 4,58 |
| | 53 | 97,20 | 139,1 | 175,4 | 218,1 | 242,5 | 273,9 | 286,4 | 302,6 | 240,6 | 4,30 |
| | 54 | 102,9 | 134,4 | 163,2 | 199,4 | 230,9 | 268,1 | 282,2 | 296,5 | 233,5 | 4,17 |
| V | 55 | 90,70 | 108,8 | 140,5 | *167,2* | *183,7* | 215,0 | 232,9 | 246,7 | 182,2 | 3,25 |
| | 56 | 106,1 | 138,8 | 192,7 | 226,1 | 245,6 | 260,9 | 273,8 | 290,7 | 225,0 | 4,02 |
| | 57 | 105,1 | 141,8 | 188,9 | 224,0 | 253,0 | 285,7 | 299,4 | 311,7 | 244,2 | 4,36 |
| | 58 | 100,6 | 134,9 | 175,3 | 211,6 | 234,1 | 264,1 | 277,2 | 282,4 | 214,6 | 3,83 |
| | 59 | 94,50 | 132,1 | 165,9 | 204,4 | 234,3 | 260,3 | 272,0 | 287,8 | 232,2 | 4,15 |
| | M | 98,56 | 133,1 | 172,7 | 215,2 | 242,6 | 264,3 | 277,6 | 291,7 | 229,0 | 4,09 |
| | SD | 5,52 | 9,36 | 14,57 | 8,95 | 7,97 | 19,26 | 18,51 | 20,29 | | |

***Tabelle A2c:*** *Wöchentliche Lebendmasseentwicklung, Gesamtlebendmasse-zunahmen, tägliche Zunahmen in Versuch 1*

| Versuch 1 | | Lebendmasseentwicklung (g) | | | | | | | | $LMZ_G$ (g) | TZ (g/d) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe/Tier | | $d_{1-7}$ | $d_{8-14}$ | $d_{15-21}$ | $d_{22-28}$ | $d_{29-35}$ | $d_{36-42}$ | $d_{43-49}$ | $d_{50-56}$ | $d_{1-56}$ | |
| | 61 | 100,8 | 136,4 | 175,6 | 212,2 | 235,8 | 256,9 | 270,0 | 292,8 | 234,1 | 4,18 |
| | 62 | 100,7 | 141,5 | 188,9 | 223,2 | 247,3 | 275,8 | 288,5 | 313,4 | 253,5 | 4,53 |
| | 63 | 96,40 | 127,6 | 158,1 | 185,7 | 204,7 | 230,4 | 248,7 | 268,1 | 206,0 | 3,68 |
| | 64 | 100,4 | 134,2 | 187,9 | 236,6 | 270,5 | 304,4 | - | 349,0 | 286,5 | 5,12 |
| VI | 65 | 98,80 | 127,1 | 167,0 | 201,4 | 224,2 | 255,9 | 256,2 | 265,9 | 201,1 | 3,59 |
| | 66 | 85,90 | 112,1 | 135,2 | 167,8 | 196,8 | 234,0 | 255,9 | 282,9 | 217,4 | 3,88 |
| | 67 | 108,1 | 149,7 | 190,7 | 228,1 | 255,6 | 284,5 | 298,4 | 318,7 | 251,1 | 4,48 |
| | 68 | 86,30 | 115,6 | 150,2 | *168,1* | 186,3 | 212,4 | 224,7 | 272,2 | 204,4 | 3,65 |
| | 69 | 100,5 | 140,9 | 190,9 | 228,1 | 262,8 | 283,6 | 288,8 | 305,9 | 250,4 | 4,47 |
| | M | 97,54 | 131,7 | 171,6 | 210,4 | 231,6 | 259,8 | 266,4 | 296,5 | 233,8 | 4,18 |
| | SD | 6,78 | 11,62 | 19,16 | 22,32 | 28,61 | 28,33 | 23,17 | 27,74 | | |

***Tabelle A3a:*** *Wöchentliche Futteraufnahme, Gesamtfutteraufnahme, Futterverwertung in Versuch 2*

| Versuch 2 | | Wöchentliche Futteraufnahme (g) | | | | | | | | $FA_G$ (g) | FV (g/g) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | Tier | $d_{1-7}$ | $d_{8-14}$ | $d_{15-21}$ | $d_{22-28}$ | $d_{29-35}$ | $d_{36-42}$ | $d_{43-49}$ | $d_{50-56}$ | $d_{1-56}$ | |
| | 011 | 69,21 | 122,79 | 137,1 | 140,1 | 147,7 | 155,9 | 149,0 | 126,1 | 1048 | 3,70 |
| | 012 | 82,62 | 106,17 | 114,4 | 128,9 | 133,0 | 140,0 | 142,8 | 118,2 | 966,1 | 3,67 |
| | 013 | 75,61 | 79,22 | 110,7 | 119,4 | 128,8 | 135,0 | 144,2 | 123,8 | 916,6 | 3,61 |
| | 014 | 79,06 | 27,94 | 114,6 | 128,3 | 127,2 | 126,3 | 133,4 | 108,6 | 845,4 | 3,56 |
| 0 | 015 | 82,28 | 109,67 | 115,5 | 123,4 | 136,3 | 141,3 | 137,2 | 131,4 | 977,0 | 4,12 |
| | 016 | 89,67 | 119,27 | 120,4 | 128,6 | 137,8 | 141,7 | 134,2 | 136,5 | 1008 | 4,42 |
| | 017 | 99,18 | 101,76 | 132,8 | 143,3 | 140,0 | 141,4 | 139,3 | 142,9 | 1041 | 4,09 |
| | M | 82,25 | 95,26 | 120,8 | 130,3 | 135,8 | 140,2 | 140,0 | 126,8 | 971,7 | 3,88 |
| | SD | 9,71 | 32,90 | 10,16 | 8,57 | 7,00 | 8,87 | 5,67 | 11,46 | 71,81 | |
| | 111 | 92,17 | 116,77 | 127,0 | 135,0 | 145,8 | 143,7 | 140,3 | 125,3 | 1026 | 3,60 |
| | 112 | 88,56 | 111,3 | 132,5 | 151,3 | 145,7 | 144,3 | 146,1 | 125,3 | 1036 | 3,92 |
| | 113 | 92,94 | 123,4 | 116,3 | 139,4 | 146,6 | 148,4 | 150,8 | 130,1 | 1048 | 3,53 |
| | 114 | 92,37 | 120,6 | 135,2 | 141,3 | 135,9 | 158,5 | 144,8 | 127,8 | 1056 | 3,74 |
| I | 115 | 94,61 | 116,3 | 130,7 | 138,0 | 147,1 | 148,9 | 148,2 | 162,8 | 1086 | 3,78 |
| | 116 | 95,11 | 126,8 | 134,8 | 135,6 | 152,5 | 152,8 | 150,0 | 156,3 | 1104 | 3,60 |
| | 117 | 100,2 | 112,4 | 151,4 | 159,1 | 165,9 | 170,0 | 170,6 | 175,5 | 1206 | 3,77 |
| | M | 93,71 | 118,2 | 131,3 | 142,8 | 148,8 | 152,5 | 150,1 | 143,3 | 1080 | 3,71 |
| | SD | 3,57 | 5,69 | 11,09 | 9,03 | 9,12 | 9,50 | 9,71 | 21,0 | 61,75 | |
| | 211 | 76,27 | 109,1 | 126,1 | 136,0 | 132,5 | 143,1 | 143,7 | 126,3 | 993,0 | 3,70 |
| | 212 | 85,71 | 121,8 | 132,2 | 146,7 | 156,7 | 149,0 | 150,2 | 132,0 | 1074 | 3,75 |
| | 213 | 84,87 | 119,3 | 135,3 | 142,3 | 150,9 | 147,9 | 163,4 | 129,0 | 1073 | 3,77 |
| | 214 | 80,65 | 128,6 | 142,3 | 145,1 | 153,7 | 154,1 | 157,0 | 137,5 | 1099 | 3,63 |
| II | 215 | 77,66 | 122,7 | 145,3 | 148,3 | 167,0 | 162,7 | 178,8 | 162,3 | 1165 | 3,68 |
| | 216 | 87,95 | 126,7 | 137,8 | 146,9 | 147,1 | 145,1 | 149,2 | 160,4 | 1101 | 3,76 |
| | 217 | 94,87 | 136,2 | 133,3 | 171,4 | 180,8 | 172,2 | 177,8 | 172,5 | 1239 | 3,83 |
| | M | 84,00 | 123,5 | 136,0 | 148,1 | 155,5 | 153,4 | 160,0 | 145,7 | 1106 | 3,73 |
| | SD | 6,44 | 8,44 | 6,45 | 11,05 | 15,26 | 10,52 | 13,96 | 18,78 | 77,51 | |
| | 311 | 86,77 | 105,6 | 115,3 | 128,3 | 137,4 | 146,9 | 149,0 | 132,3 | 1002 | 3,66 |
| | 312 | 88,33 | 111,8 | 115,7 | 132,0 | 141,4 | 136,8 | 146,7 | 122,6 | 995,2 | 3,66 |
| | 313 | 85,62 | 111,6 | 125,5 | 130,8 | 142,8 | 143,3 | 146,4 | 125,2 | 1011 | 3,70 |
| | 314 | 89,82 | 121,7 | 130,6 | 144,1 | 157,4 | 146,1 | 147,5 | 128,4 | 1066 | 3,58 |
| III | 315 | 81,46 | 110,9 | 123,5 | 123,2 | 149,11 | 136,2 | 155,2 | 145,0 | 1025 | 3,76 |
| | 316 | 90,32 | 117,7 | 126,4 | 144,2 | 137,9 | 126,0 | 138,5 | 134,7 | 1016 | 3,74 |
| | 317 | 95,26 | 119,3 | 128,1 | 127,5 | 148,8 | 154,1 | 142,4 | 140,0 | 1054 | 3,86 |
| | M | 88,23 | 114,1 | 123,6 | 132,9 | 145,0 | 141,3 | 146,5 | 132,4 | 1024 | 3,71 |
| | SD | 4,30 | 5,66 | 5,94 | 8,19 | 7,19 | 9,14 | 5,25 | 7,86 | 26,51 | |

***Tabelle A3b:*** *Wöchentliche Futteraufnahme, Gesamtfutteraufnahme, Futterverwertung in Versuch 2*

| Versuch 2 | | Wöchentliche Futteraufnahme (g) | | | | | | | | $FA_G$ (g) | FV (g/g) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | Tier | $d_{1-7}$ | $d_{8-14}$ | $d_{15-21}$ | $d_{22-28}$ | $d_{29-35}$ | $d_{36-42}$ | $d_{43-49}$ | $d_{50-56}$ | $d_{1-56}$ | |
| | 411 | 96,23 | 124,6 | 126,7 | 135,3 | 157,1 | 155,8 | 136,8 | 148,2 | 1081 | 3,85 |
| | 412 | 94,02 | 119,5 | 130,6 | 145,8 | 151,7 | 142,3 | 122,8 | 141,1 | 1048 | 3,84 |
| | 413 | 74,97 | 96,32 | 105,5 | 121,7 | 128,8 | 140,0 | 142,5 | 109,8 | 919,6 | 3,76 |
| | 414 | 88,79 | 124,8 | 125,4 | 146,8 | 155,4 | 139,8 | 125,1 | 136,8 | 1043 | 3,75 |
| IV | 415 | 87,27 | 118,1 | 136,2 | 140,6 | 141,0 | 138,9 | 125,8 | 155,2 | 1043 | 3,78 |
| | 416 | 93,57 | 112,8 | 124,0 | 134,7 | 140,6 | 131,7 | 141,3 | 136,0 | 1014 | 3,82 |
| | 417 | 95,26 | 109,8 | 135,4 | 143,7 | 140,4 | 147,8 | 132,7 | 169,6 | 1075 | 3,89 |
| | M | 90,02 | 115,1 | 126,2 | 138,4 | 145,0 | 142,3 | 132,4 | 142,4 | 1032 | 3,81 |
| | SD | 7,42 | 9,99 | 10,32 | 8,75 | 10,14 | 7,64 | 8,05 | 18,59 | 54,21 | |
| | 511 | 88,04 | 107,7 | 130,32 | 148,2 | 157,4 | 154,1 | 160,5 | 133,2 | 1079 | 4,12 |
| | 512 | 71,73 | 100,2 | 118,4 | 131,0 | 146,9 | 152,0 | 155,0 | 126,2 | 1001 | 3,70 |
| | 513 | 73,19 | 109,2 | 119,2 | 141,7 | 141,2 | 146,4 | 144,6 | 126,8 | 1002 | 3,86 |
| | 514 | 87,66 | 116,6 | 136,9 | 137,8 | 142,6 | 142,3 | 148,3 | 121,2 | 1033 | 3,63 |
| V | 515 | 67,01 | 111,3 | 120,3 | 138,7 | 159,0 | 150,9 | 148,5 | 158,1 | 1054 | 3,56 |
| | 516 | 85,43 | 114,1 | 119,8 | 124,0 | 139,7 | 128,3 | 140,1 | 125,5 | 976,8 | 3,93 |
| | 517 | 88,12 | 114,0 | 128,5 | 142,3 | 140,5 | 135,3 | 133,5 | 130,8 | 1013 | 4,09 |
| | M | 80,17 | 110,4 | 124,8 | 137,7 | 146,7 | 144,2 | 147,2 | 131,7 | 1023 | 3,84 |
| | SD | 9,15 | 5,47 | 7,17 | 7,97 | 8,17 | 9,52 | 9,01 | 12,28 | 35,09 | |
| | 611 | 87,72 | 97,42 | 131,3 | 144,9 | 148,8 | 159,3 | 159,0 | 137,6 | 1066 | 3,63 |
| | 612 | 71,42 | 104,1 | 130,4 | 143,8 | 146,3 | 153,7 | 149,2 | 129,6 | 1028 | 4,11 |
| | 613 | 79,89 | 98,81 | 122,0 | 135,3 | 139,1 | 136,9 | 139,9 | 113,2 | 964,9 | 3,69 |
| | 614 | 71,88 | 101,1 | 127,7 | 139,4 | 145,2 | 143,8 | 155,3 | 124,5 | 1009 | 3,62 |
| VI | 615 | 58,69 | 105,1 | 126,9 | 125,3 | 128,6 | 128,8 | 144,6 | 132,9 | 950,9 | 3,81 |
| | 616 | 82,05 | 93,82 | 120,5 | 126,2 | 135,7 | 123,2 | 138,3 | 142,0 | 961,7 | 3,76 |
| | 617 | 88,49 | 109,83 | 114,0 | 134,1 | 134,0 | 137,0 | 147,5 | 139,3 | 1004 | 3,92 |
| | M | 77,16 | 101,5 | 124,7 | 135,6 | 139,7 | 140,4 | 147,7 | 131,3 | 997,9 | 3,79 |
| | SD | 10,59 | 5,36 | 6,19 | 7,81 | 7,41 | 12,91 | 7,61 | 9,98 | 41,54 | |

***Tabelle A4a:*** *Wöchentliche Lebendmasseentwicklung, Gesamtlebendmasse-zunahmen, tägliche Zunahmen in Versuch 2*

| Versuch 2 | | Lebendmasseentwicklung (g) | | | | | | | | $LMZ_G$ (g) | TZ (g/d) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | Tier | $d_{1-7}$ | $d_{8-14}$ | $d_{15-21}$ | $d_{22-28}$ | $d_{29-35}$ | $d_{36-42}$ | $d_{43-49}$ | $d_{50-56}$ | $d_{1-56}$ | |
| 0 | 011 | 92,70 | 141,1 | 189,1 | 229,1 | 269,6 | 301,9 | 322,6 | 339,3 | 283,2 | 5,06 |
| | 012 | 97,10 | 137,2 | 176,7 | 214,7 | 250,0 | 279,6 | 302,6 | 320,9 | 262,9 | 4,69 |
| | 013 | 97,20 | 118,6 | 165,2 | 202,9 | 241,7 | 273,4 | 294,6 | 312,8 | 254,2 | 4,54 |
| | 014 | 95,50 | 137,9 | 175,9 | 215,0 | 245,8 | 265,5 | 282,1 | 297,8 | 237,7 | 4,24 |
| | 015 | 99,20 | 141,2 | 174,5 | 208,4 | 241,2 | 266,6 | 284,2 | 297,7 | 237,1 | 4,23 |
| | 016 | 108,6 | 148,6 | 182,2 | 214,8 | 243,3 | 263,3 | 279,9 | 292,8 | 228,3 | 4,08 |
| | 017 | 109,0 | 140,6 | 183,5 | 226,4 | 256,6 | 281,1 | 300,4 | 320,2 | 254,7 | 4,55 |
| | M | 99,90 | 137,9 | 178,2 | 216,0 | 249,7 | 276,0 | 295,2 | 311,6 | 251,2 | 4,48 |
| | SD | 5,92 | 8,58 | 7,10 | 8,56 | 9,53 | 12,40 | 13,94 | 15,43 | | |
| I | 111 | 107,6 | 152,4 | 194,5 | 234,7 | 273,6 | 298,2 | 319,6 | 341,0 | 284,8 | 5,09 |
| | 112 | 105,6 | 150,8 | 189,4 | 233,3 | 264,9 | 286,4 | 305,0 | 322,2 | 264,2 | 4,72 |
| | 113 | 110,0 | 159,1 | 196,3 | 242,8 | 278,6 | 312,8 | 333,1 | 355,4 | 296,6 | 5,30 |
| | 114 | 111,8 | 157,2 | 201,2 | 242,3 | 275,2 | 307,1 | 324,0 | 342,3 | 282,2 | 5,04 |
| | 115 | 113,3 | 157,8 | 203,7 | 243,5 | 278,1 | 302,7 | 322,1 | 348,3 | 287,4 | 5,13 |
| | 116 | 115,8 | 165,7 | 210,0 | 254,7 | 292,9 | 323,0 | 346,1 | 371,4 | 307,0 | 5,48 |
| | 117 | 123,8 | 181,5 | 237,8 | 275,8 | 312,1 | 342,4 | 364,2 | 385,4 | 319,5 | 5,71 |
| | M | 112,6 | 160,6 | 204,7 | 246,7 | 282,2 | 310,4 | 330,6 | 352,3 | 291,7 | 5,21 |
| | SD | 5,57 | 9,62 | 14,86 | 13,52 | 14,44 | 16,83 | 18,00 | 19,35 | | |
| II | 211 | 94,60 | 135,5 | 181,2 | 221,3 | 254,1 | 284,9 | 305,4 | 325,0 | 268,7 | 4,80 |
| | 212 | 105,7 | 157,2 | 201,9 | 242,8 | 277,9 | 303,6 | 321,3 | 344,0 | 286,2 | 5,11 |
| | 213 | 105,4 | 155,5 | 201,9 | 241,3 | 277,4 | 298,5 | 327,0 | 343,7 | 284,8 | 5,09 |
| | 214 | 96,70 | 153,6 | 204,2 | 248,9 | 287,7 | 320,3 | 342,4 | 363,0 | 302,9 | 5,41 |
| | 215 | 102,7 | 160,3 | 209,7 | 257,3 | 302,8 | 329,3 | 357,4 | 377,2 | 316,2 | 5,65 |
| | 216 | 105,9 | 158,9 | 209,5 | 250,3 | 282,8 | 310,0 | 329,1 | 356,3 | 292,9 | 5,23 |
| | 217 | 119,5 | 172,1 | 211,3 | 260,7 | 308,8 | 337,0 | 359,3 | 390,1 | 323,7 | 5,78 |
| | M | 104,4 | 156,2 | 202,8 | 246,1 | 284,5 | 311,9 | 334,6 | 357,0 | 296,5 | 5,29 |
| | SD | 7,48 | 10,10 | 9,52 | 12,03 | 16,72 | 16,84 | 18,16 | 20,39 | | |
| III | 311 | 102,4 | 139,2 | 173,1 | 211,9 | 250,4 | 284,4 | 307,6 | 329,9 | 273,5 | 4,88 |
| | 312 | 102,9 | 143,2 | 175,2 | 217,5 | 258,0 | 288,1 | 308,7 | 329,6 | 271,9 | 4,86 |
| | 313 | 106,3 | 151,5 | 196,7 | 233,7 | 272,4 | 298,3 | 314,9 | 332,2 | 273,3 | 4,88 |
| | 314 | 108,5 | 156,5 | 200,7 | 245,6 | 286,4 | 314,4 | 332,3 | 357,7 | 297,7 | 5,32 |
| | 315 | 104,3 | 147,5 | 189,5 | 222,9 | 264,1 | 290,0 | 311,9 | 333,7 | 272,6 | 4,87 |
| | 316 | 109,0 | 153,8 | 197,5 | 240,5 | 273,0 | 295,3 | 308,6 | 334,1 | 271,3 | 4,84 |
| | 317 | 113,4 | 158,6 | 200,4 | 237,7 | 278,1 | 305,1 | 319,5 | 339,2 | 272,8 | 4,87 |
| | M | 106,7 | 150,0 | 190,4 | 230,0 | 268,9 | 296,5 | 314,8 | 336,6 | 276,2 | 4,93 |
| | SD | 3,63 | 6,57 | 10,87 | 11,72 | 11,36 | 9,70 | 8,14 | 9,10 | | |

***Tabelle A4b:*** *Wöchentliche Lebendmasseentwicklung, Gesamtlebendmasse-zunahmen, tägliche Zunahmen in Versuch 2*

| Versuch 2 | | Lebendmasseentwicklung (g) | | | | | | | | $LMZ_G$ (g) | TZ (g/d) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | Tier | $d_{1-7}$ | $d_{8-14}$ | $d_{15-21}$ | $d_{22-28}$ | $d_{29-35}$ | $d_{36-42}$ | $d_{43-49}$ | $d_{50-56}$ | $d_{1-56}$ | |
| | 411 | 108,2 | 157,1 | 195,5 | 233,7 | 269,2 | 300,1 | 308,6 | 337,3 | 280,6 | 5,01 |
| | 412 | 106,2 | 157,1 | 194,8 | 235,8 | 271,3 | 295,6 | 297,9 | 330,3 | 272,8 | 4,87 |
| | 413 | 93,60 | 125,5 | *158,8* | 195,1 | 229,1 | 262,9 | 283,5 | 303,4 | 244,5 | 4,37 |
| | 414 | 106,5 | 157,8 | 195,3 | 240,0 | 278,3 | 300,0 | 308,1 | 337,9 | 278,0 | 4,96 |
| IV | 415 | 110,0 | 156,3 | 203,8 | 241,6 | 274,3 | 301,2 | 307,5 | 337,0 | 275,9 | 4,93 |
| | 416 | 109,9 | 150,1 | 194,1 | 232,1 | 267,3 | 290,7 | 305,4 | 327,7 | 265,5 | 4,74 |
| | 417 | 110,1 | 144,0 | 191,1 | 235,9 | 268,8 | 300,4 | 309,9 | 342,9 | 276,5 | 4,94 |
| | M | 106,4 | 149,7 | 195,8 | 230,6 | 265,5 | 293,0 | 303,0 | 330,9 | 270,5 | 4,83 |
| | SD | 5,43 | 10,93 | 3,88 | 14,82 | 15,25 | 12,76 | 8,76 | 12,18 | | |
| | 511 | 103,1 | 142,2 | 184,6 | 224,4 | 260,4 | 281,9 | 301,5 | 319,1 | 262,3 | 4,68 |
| | 512 | 96,60 | 128,3 | 169,6 | 210,9 | 252,4 | 282,1 | 302,6 | 328,0 | 270,6 | 4,83 |
| | 513 | 90,00 | 131,1 | 173,5 | 214,4 | 250,4 | 280,7 | 287,8 | 318,8 | 259,8 | 4,64 |
| | 514 | 105,0 | 152,0 | 199,4 | 238,9 | 274,0 | 304,0 | 321,4 | 344,3 | 284,8 | 5,09 |
| V | 515 | 89,5 | 142,0 | 189,6 | 234,1 | 276,6 | 307,8 | *392,2* | 357,1 | 295,7 | 5,28 |
| | 516 | 102,4 | 146,4 | 188,2 | 220,1 | 257,7 | 278,8 | 297,3 | 310,5 | 248,4 | 4,44 |
| | 517 | 108,1 | 147,7 | 192,9 | 234,6 | 263,7 | 286,2 | 298,5 | 314,5 | 247,7 | 4,42 |
| | M | 99,24 | 141,4 | 185,4 | 225,3 | 262,2 | 288,8 | 301,5 | 327,5 | 267,0 | 4,77 |
| | SD | 6,80 | 8,07 | 9,78 | 10,02 | 9,32 | 11,06 | 10,10 | 15,87 | | |
| | 611 | 107,3 | 140,5 | 190,0 | 234,1 | 271,3 | 304,8 | 330,0 | 350,2 | 293,3 | 5,24 |
| | 612 | 90,50 | 130,4 | 173,1 | 213,0 | 247,1 | 275,4 | 289,3 | 307,5 | 250,4 | 4,47 |
| | 613 | 102,9 | 136,3 | 179,9 | 219,6 | 254,2 | 280,6 | 300,1 | 320,7 | 261,6 | 4,67 |
| | 614 | 90,60 | 129,6 | 176,8 | 220,4 | 257,1 | 289,1 | 316,2 | 337,8 | 278,5 | 4,97 |
| VI | 615 | 82,50 | 132,0 | 174,4 | 210,4 | 242,7 | 270,2 | 289,2 | 310,8 | 249,4 | 4,45 |
| | 616 | 100,1 | 128,3 | 173,9 | 213,3 | 247,1 | 270,7 | 290,7 | 317,2 | 255,7 | 4,57 |
| | 617 | 106,0 | 143,0 | 183,1 | 221,5 | 254,2 | 279,7 | 300,2 | 323,1 | 256,0 | 4,57 |
| | M | 97,13 | 134,3 | 178,7 | 218,9 | 253,4 | 281,5 | 302,2 | 323,9 | 263,6 | 4,71 |
| | SD | 8,66 | 5,30 | 5,67 | 7,36 | 8,70 | 11,25 | 14,37 | 14,05 | | |

***Tabelle A5a:*** *Selengehalte und Selenoenzymaktivitäten in Leber und Plasma von Versuch 1*

| Versuch 1 | | Blutplasma | | Leber | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | | Se (µg/kg) | pGPx (mU/mg Prot.) | Se (µg/kg) | cGPx (mU/mg Prot.) | TrxR1 (mU/mg Prot.) | TrxR2 (Q:TrxR2/SDH) |
| | 01 | 35,15 | 1,98 | 24,28 | 9,85 | 2,06 | 0,25 |
| | 02 | 28,06 | 2,63 | 24,23 | 7,92 | 1,99 | 0,25 |
| | 03 | 26,56 | 3,00 | 23,51 | 10,46 | 1,37 | 1,49 |
| | 04 | 25,43 | 2,54 | 18,15 | 11,81 | 1,57 | 1,04 |
| | 05 | 33,10 | 3,00 | 21,61 | 5,39 | 2,12 | 0,59 |
| 0 | 06 | 28,80 | 3,61 | 21,89 | 5,43 | 2,16 | 0,60 |
| | 07 | 25,41 | 2,30 | 18,88 | 4,62 | 1,74 | 0,39 |
| | 08 | 27,60 | 2,59 | 19,77 | 6,71 | 1,18 | 0,33 |
| | 09 | 24,31 | 2,32 | 18,71 | 11,96 | 1,30 | 0,33 |
| | M | 28,27 | 2,66 | 21,22 | 8,24 | 1,72 | 0,54 |
| | SD | 3,60 | 0,48 | 2,40 | 2,87 | 0,38 | 0,33 |
| | 11 | 508,7 | *129,55* | 981,5 | *958,2* | 5,94 | 1,77 |
| | 12 | 541,9 | 87,11 | 1005 | 659,5 | 6,00 | 1,71 |
| | 13 | 549,2 | 94,85 | 1057 | 623,9 | 5,55 | 2,49 |
| | 14 | 542,3 | 79,73 | 1130 | 661,2 | 5,99 | 3,23 |
| I | 15 | 581,1 | 94,93 | 1048 | 524,1 | 6,27 | 1,12 |
| | 16 | 533,2 | 67,31 | 863,7 | 634,5 | 7,05 | 3,02 |
| | 17 | 554,2 | 59,92 | 1039 | 662,3 | 6,47 | 2,48 |
| | 18 | 609,7 | 85,78 | 1130 | 705,6 | 6,17 | 0,90 |
| | 19 | - | 80,28 | 1143 | 830,0 | 5,11 | 1,85 |
| | M | 552,5 | 81,24 | 1044 | 662,6 | 6,06 | 2,04 |
| | SD | 30,7 | 12,42 | 88,6 | 85,65 | 0,55 | 0,72 |
| | 21 | 496,6 | 59,92 | 1040 | 553,6 | 5,88 | 1,88 |
| | 22 | 592,5 | 86,44 | - | - | - | - |
| | 23 | 506,8 | 79,48 | 1004 | 472,4 | 6,83 | 2,43 |
| II | 24 | 542,0 | 70,17 | 1097 | 702,6 | 6,30 | 3,22 |
| | 25 | 538,5 | 93,39 | 922,1 | 616,8 | 6,84 | 3,58 |
| | 26 | 528,6 | 62,93 | 1112 | 716,3 | 4,14 | 3,01 |
| | 27 | 488,8 | 57,29 | 977,0 | 701,0 | 7,55 | 3,32 |
| | 28 | 569,4 | 70,65 | 1159 | 726,2 | 6,37 | 3,74 |
| | 29 | 643,0 | 62,47 | 1085 | 746,4 | 6,20 | 0,41 |
| | M | 545,1 | 71,41 | 1050 | 654,4 | 6,26 | 2,90 |
| | SD | 49,70 | 12,55 | 78,4 | 97,57 | 1,00 | 0,87 |

***Tabelle A5b:*** *Selengehalte und Selenoenzymaktivitäten in Leber und Plasma von Versuch 1*

| Versuch 1 | | Blutplasma | | Leber | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | | Se (µg/kg) | pGPx (mU/mg Prot.) | Se (µg/kg) | cGPx (mU/mg Prot.) | TrxR1 (mU/mg Prot.) | TrxR2 (Q:TrxR2/SDH) |
| | 31 | 695,4 | 79,80 | 2054 | 584,3 | 6,16 | 1,97 |
| | 32 | 585,3 | 68,84 | 2173 | 494,6 | 6,47 | 2,63 |
| | 33 | 582,8 | 53,19 | 2147 | 507,9 | 7,16 | 3,33 |
| | 34 | 679,4 | 63,07 | 2402 | 602,6 | 7,39 | 2,12 |
| III | 35 | 681,7 | 65,25 | 2503 | 620,8 | 6,96 | 1,59 |
| | 36 | 681,6 | 82,06 | 2160 | 559,2 | 6,58 | 2,45 |
| | 37 | 636,8 | 66,96 | 2393 | 613,1 | 7,18 | 3,71 |
| | 38 | 648,7 | 70,18 | 2375 | 549,4 | 7,12 | 2,13 |
| | 39 | 735,8 | 69,80 | 1894 | 532,4 | 6,46 | 1,65 |
| | M | 658,6 | 68,79 | 2233 | 562,7 | 6,83 | 2,43 |
| | SD | 50,60 | 8,60 | 197,0 | 45,71 | 0,42 | 0,71 |
| | 41 | 585,7 | 73,22 | *1274* | 502,7 | 5,95 | 1,60 |
| | 42 | 559,5 | 63,91 | 2039 | 406,8 | 6,58 | 2,46 |
| | 43 | 676,9 | 78,94 | 2467 | 475,3 | 5,97 | 1,03 |
| | 44 | 636,6 | 77,14 | 2097 | 545,7 | 6,82 | 2,11 |
| | 45 | 570,2 | 76,28 | 2050 | 464,1 | 6,46 | 2,40 |
| IV | 46 | 577,6 | 82,32 | *1486* | 540,7 | 6,75 | 3,10 |
| | 47 | 619,5 | 78,87 | 2165 | 745,6 | 6,13 | 1,54 |
| | 48 | 692,7 | 82,58 | 2250 | 506,1 | 7,36 | 2,09 |
| | 49 | 726,2 | 82,93 | 2220 | 515,8 | 7,03 | 1,70 |
| | M | 627,2 | 77,35 | 2184 | 522,5 | 6,56 | 2,00 |
| | SD | 59,90 | 5,99 | 148,7 | 93,79 | 0,48 | 0,58 |
| | 51 | 839,2 | 84,15 | 2953 | 284,3 | 6,28 | 2,84 |
| | 52 | 788,9 | 66,83 | 3305 | 276,9 | 8,35 | 1,75 |
| | 53 | 710,5 | 59,01 | 3074 | 354,2 | 8,17 | 3,60 |
| | 54 | 655,2 | 68,46 | 2403 | 364,2 | 6,45 | 1,60 |
| V | 55 | 710,3 | 74,62 | 2910 | 552,3 | 7,29 | 2,55 |
| | 56 | 673,1 | 56,22 | 2512 | 440,8 | 7,39 | 2,12 |
| | 57 | - | *124,68* | 3158 | 375,3 | 7,41 | 5,58 |
| | 58 | 735,0 | 70,60 | 3057 | 306,2 | 7,15 | 3,39 |
| | 59 | 822,0 | 104,33 | 2682 | 437,0 | 6,83 | 2,11 |
| | M | 741,8 | 73,03 | 2895 | 376,8 | 7,26 | 2,70 |
| | SD | 68,0 | 15,36 | 302,9 | 88,54 | 0,70 | 1,10 |

***Tabelle A5c:*** *Selengehalte und Selenoenzymaktivitäten in Leber und Plasma von Versuch 1*

| Versuch 1 | | Blutplasma | | Leber | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | | Se (µg/kg) | pGPx (mU/mg Prot.) | Se (µg/kg) | cGPx (mU/mg Prot.) | TrxR1 (mU/mg Prot.) | TrxR2 (Q:TrxR2/SDH) |
| | 61 | 737,2 | 70,26 | 3060 | 791,1 | 6,26 | 1,88 |
| | 62 | 717,2 | 29,91 | 2929 | 805,0 | 7,23 | 2,22 |
| | 63 | 591,8 | 49,60 | 2924 | 759,6 | 6,99 | 2,19 |
| | 64 | 684,7 | 63,84 | 2878 | 546,0 | 7,99 | 4,00 |
| VI | 65 | 567,0 | 62,00 | 2793 | *1934,2* | 6,06 | 2,95 |
| | 66 | 599,7 | 61,96 | 2984 | 706,3 | 4,59 | 4,78 |
| | 67 | 684,3 | 52,68 | 2792 | 713,2 | 6,59 | 1,41 |
| | 68 | 713,4 | 59,55 | 2941 | 885,3 | 5,02 | 2,52 |
| | 69 | 784,2 | 69,69 | 3381 | 763,3 | 6,41 | 3,31 |
| | M | 675,5 | 57,72 | 2965 | 746,2 | 6,35 | 2,81 |
| | SD | 73,70 | 12,46 | 177,8 | 98,58 | 1,05 | 1,01 |

***Tabelle A6a:*** *Selengehalte und Selenoenzymaktivitäten in Leber und Plasma von Versuch 2*

| Versuch 2 | | Blutplasma | | Leber | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | | Se (µg/kg) | pGPx (mU/mg Prot.) | Se (µg/kg) | cGPx (mU/mg Prot.) | PHGPx (mU/mg Prot.) |
| | 011 | 24,2 | 2,10 | 16,6 | 1,11 | 0,14 |
| | 012 | 23,6 | - | 16,4 | 5,67 | 0,21 |
| | 013 | 26,0 | 2,15 | 21,6 | 4,79 | 0,21 |
| 0 | 014 | 21,2 | 0,18 | 17,6 | 11,08 | 0,25 |
| | 015 | 18,9 | 2,34 | 17,2 | 2,79 | 0,21 |
| | 016 | 27,0 | 1,58 | 20,0 | 4,51 | 0,17 |
| | 017 | 19,8 | 2,42 | 19,9 | 4,93 | 0,19 |
| | M | 22,94 | 1,80 | 18,45 | 4,98 | 0,20 |
| | SD | 3,10 | 0,85 | 2,01 | 3,10 | 0,03 |
| | 111 | 525,3 | 125,4 | 1134 | 518,5 | 0,56 |
| | 112 | 550,5 | *206,1* | 1140 | 437,5 | 0,46 |
| | 113 | 518,1 | 117,9 | 1046 | 402,2 | 0,32 |
| I | 114 | 544,9 | 137,5 | 958,5 | 415,9 | 0,32 |
| | 115 | 554,7 | 110,5 | 1009 | 379,3 | 0,38 |
| | 116 | 577,9 | 114,5 | 1102 | 388,8 | 0,42 |
| | 117 | 534,8 | 108,3 | 984,2 | 435,2 | 0,51 |
| | M | 543,7 | 119,0 | 1054 | 425,3 | 0,42 |
| | SD | 20,1 | 10,87 | 73,30 | 46,53 | 0,08 |
| | 211 | 560,2 | *88,03* | 1331 | 587,4 | 0,35 |
| | 212 | 517,4 | 126,7 | 1200 | 432,0 | 0,29 |
| | 213 | 608,2 | 173,6 | 1244 | 496,0 | 0,32 |
| II | 214 | 555,2 | 131,1 | 1423 | 530,9 | 0,31 |
| | 215 | 567,7 | 160,4 | 1289 | 319,1 | 0,48 |
| | 216 | 607,2 | 128,0 | 1473 | 375,3 | 0,45 |
| | 217 | 580,8 | 172,8 | 1439 | 440,3 | 0,38 |
| | M | 571,0 | 148,8 | 1343 | 454,4 | 0,37 |
| | SD | 31,80 | 22,64 | 104,9 | 91,78 | 0,07 |
| | 311 | 648,9 | 186,1 | 2547 | 493,5 | 0,35 |
| | 312 | 665,5 | 124,8 | 2585 | 434,8 | 0,46 |
| | 313 | 684,1 | 155,0 | 2252 | 373,2 | 0,33 |
| III | 314 | 640,3 | 192,2 | 2412 | 470,6 | 0,46 |
| | 315 | 638,2 | 135,2 | 2473 | 501,4 | 0,32 |
| | 316 | 645,1 | 161,7 | 2544 | 436,2 | 0,53 |
| | 317 | 616,8 | 170,5 | *2090* | 472,4 | 0,58 |
| | M | 648,4 | 160,8 | 2469 | 455,2 | 0,43 |
| | SD | 21,4 | 24,83 | 122,8 | 43,76 | 0,10 |

***Tabelle A6b:*** *Selengehalte und Selenoenzymaktivitäten in Leber und Plasma von Versuch 2*

| Versuch 2 | | Blutplasma | | Leber | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | | Se (µg/kg) | pGPx (mU/mg Prot.) | Se (µg/kg) | cGPx (mU/mg Prot.) | PHGPx (mU/mg Prot.) |
| | 411 | 615,4 | 136,3 | 2954 | 431,6 | 0,34 |
| | 412 | 595,2 | 136,5 | 2468 | 407,8 | 0,37 |
| | 413 | 576,9 | 130,2 | 2287 | 376,2 | 0,28 |
| IV | 414 | 542,1 | 133,6 | 2299 | 451,5 | 0,35 |
| | 415 | 665,8 | 158,6 | 2093 | 360,6 | 0,35 |
| | 416 | 611,1 | 115,1 | 2217 | 366,0 | 0,34 |
| | 417 | 662,6 | 119,4 | 2388 | 340,9 | 0,44 |
| | M | 609,9 | 132,8 | 2292 | 390,7 | 0,35 |
| | SD | 44,4 | 14,08 | 130,7 | 40,57 | 0,04 |
| | 511 | 751,4 | 138,3 | 3070 | 322,1 | 0,42 |
| | 512 | 662,2 | 134,1 | *2358* | 355,9 | 0,35 |
| | 513 | 715,1 | 125,2 | 2945 | 292,1 | 0,58 |
| V | 514 | 689,8 | 143,2 | 2883 | 353,5 | 0,42 |
| | 515 | 715,8 | 151,2 | 3200 | 234,1 | 0,29 |
| | 516 | 730,3 | 108,8 | 2947 | 307,3 | 0,34 |
| | 517 | 679,9 | 155,3 | 3014 | 278,1 | 0,34 |
| | M | 706,4 | 136,6 | 3010 | 306,1 | 0,39 |
| | SD | 30,80 | 15,92 | 113,1 | 43,12 | 0,09 |
| | 611 | 767,0 | 126,1 | 3337 | 461,3 | 0,57 |
| | 612 | 695,5 | 125,3 | 2957 | 389,8 | 0,45 |
| | 613 | 642,2 | 135,8 | 3297 | 493,3 | 0,46 |
| VI | 614 | 688,6 | 122,0 | 2941 | 580,4 | 0,69 |
| | 615 | 714,5 | 169,4 | 2888 | 415,0 | 0,40 |
| | 616 | 714,4 | 154,0 | 3022 | 396,6 | 0,44 |
| | 617 | 721,6 | 152,1 | 2982 | 429,9 | 0,33 |
| | M | 706,3 | 140,7 | 3060 | 452,3 | 0,48 |
| | SD | 37,80 | 18,03 | 180,4 | 67,19 | 0,11 |

***Tabelle A7a:*** *Zellschutzparameter in der Leber von Versuch 1*

| Versuch 1 | | Leber | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | | Total GSH (µg/mg Prot.) | GSSG (µg/mg Prot.) | GSSG/GSH | GR (mU/mg Prot.) | GST (U/mg Prot.) |
| | 01 | 5,15 | 0,37 | 0,072 | 68,18 | 0,47 |
| | 02 | 6,16 | 0,89 | 0,145 | *44,18* | 0,74 |
| | 03 | 5,09 | 0,73 | 0,144 | 71,84 | 0,85 |
| | 04 | 2,50 | 0,31 | 0,124 | 81,51 | 0,93 |
| 0 | 05 | 6,40 | 1,26 | 0,197 | 48,51 | 1,01 |
| | 06 | 4,90 | 0,67 | 0,136 | 57,55 | 0,95 |
| | 07 | 4,79 | 0,36 | 0,075 | 86,85 | 0,97 |
| | 08 | 3,28 | 0,32 | 0,097 | 78,72 | 0,83 |
| | 09 | 3,71 | 0,07 | 0,019 | 92,47 | 0,69 |
| | M | 4,78 | 0,61 | 0,112 | 73,20 | 0,83 |
| | SD | 1,24 | 0,32 | 0,052 | 16,91 | 0,17 |
| | 11 | *12,24* | 1,18 | *0,096* | 41,90 | 0,50 |
| | 12 | 2,91 | 0,56 | 0,192 | 44,59 | 0,73 |
| | 13 | 5,71 | 1,32 | 0,232 | 48,66 | 0,61 |
| | 14 | 6,19 | 1,48 | 0,239 | 55,84 | 0,63 |
| I | 15 | 4,34 | 1,46 | 0,337 | 43,02 | 0,49 |
| | 16 | 4,76 | 1,02 | 0,215 | 35,06 | 0,45 |
| | 17 | 5,15 | 1,52 | 0,296 | 49,29 | 0,59 |
| | 18 | 8,24 | 1,86 | 0,226 | 60,48 | 0,59 |
| | 19 | 6,17 | 1,28 | 0,207 | 34,78 | 0,95 |
| | M | 5,43 | 1,30 | 0,243 | 45,96 | 0,62 |
| | SD | 1,47 | 0,37 | 0,049 | 8,64 | 0,15 |
| | 21 | 5,46 | 0,86 | 0,158 | 55,37 | 0,60 |
| | 22 | - | - | - | - | - |
| | 23 | 10,54 | 2,49 | 0,236 | 26,76 | 0,82 |
| | 24 | *13,81* | 3,16 | *0,229* | 18,41 | 1,39 |
| II | 25 | 6,67 | 1,39 | 0,209 | 20,10 | 1,11 |
| | 26 | 7,82 | 1,47 | 0,188 | 31,38 | 1,01 |
| | 27 | 7,66 | 1,74 | 0,227 | 27,55 | 0,65 |
| | 28 | 8,45 | 2,45 | 0,289 | 30,82 | 0,62 |
| | 29 | 7,92 | 2,28 | 0,288 | *65,81* | 0,90 |
| | M | 7,79 | 1,94 | 0,233 | 30,05 | 0,89 |
| | SD | 1,45 | 0,73 | 0,042 | 12,21 | 0,28 |

***Tabelle A7b:*** *Zellschutzparameter in der Leber von Versuch 1*

| Versuch 1 | | Leber | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | | Total GSH (µg/mg Prot.) | GSSG (µg/mg Prot.) | GSSG/TGSH | GR (mU/mg Prot.) | GST (U/mg Prot.) |
| | 31 | 9,58 | 2,68 | 0,279 | 59,04 | 0,87 |
| | 32 | 4,67 | 1,00 | 0,214 | 62,58 | 1,43 |
| | 33 | 5,60 | 1,14 | 0,204 | 46,53 | 1,02 |
| | 34 | 6,38 | 1,65 | 0,259 | 70,72 | 1,91 |
| III | 35 | 6,87 | 2,61 | 0,380 | 63,46 | 1,47 |
| | 36 | 8,60 | 2,40 | 0,279 | 37,22 | 1,61 |
| | 37 | 6,59 | 1,58 | 0,240 | 60,06 | 1,00 |
| | 38 | 7,93 | 2,19 | 0,277 | 63,14 | 1,52 |
| | 39 | 7,16 | 1,91 | 0,266 | 58,14 | 1,08 |
| | M | 7,03 | 1,91 | 0,266 | 57,88 | 1,32 |
| | SD | 1,50 | 0,61 | 0,051 | 10,05 | 0,35 |
| | 41 | 4,62 | 1,35 | 0,292 | 60,26 | 0,72 |
| | 42 | 5,25 | 1,26 | 0,241 | 58,32 | 1,53 |
| | 43 | 5,20 | 1,43 | 0,275 | 71,33 | 0,79 |
| | 44 | 5,32 | 1,66 | 0,312 | 47,84 | 0,93 |
| IV | 45 | 8,61 | 1,77 | 0,206 | 44,34 | 1,16 |
| | 46 | 9,58 | 1,65 | 0,172 | 48,73 | 1,11 |
| | 47 | 7,62 | 1,92 | 0,252 | 53,57 | 1,20 |
| | 48 | 9,07 | 1,78 | 0,196 | 45,04 | 0,99 |
| | 49 | 5,62 | 0,59 | 0,105 | 53,74 | 0,96 |
| | M | 6,91 | 1,60 | 0,228 | 53,69 | 1,04 |
| | SD | 1,89 | 0,22 | 0,065 | 8,64 | 0,24 |
| | 51 | 11,12 | 3,05 | 0,274 | 68,97 | 1,18 |
| | 52 | 9,27 | 1,56 | 0,169 | 45,39 | 1,11 |
| | 53 | 7,08 | 2,06 | 0,291 | 41,96 | 0,85 |
| | 54 | 11,77 | 2,81 | 0,239 | 39,40 | 0,97 |
| V | 55 | 6,60 | 1,83 | 0,278 | 53,73 | 1,17 |
| | 56 | 8,22 | 1,46 | 0,178 | 63,80 | 1,10 |
| | 57 | 11,84 | 2,45 | 0,207 | 53,84 | 1,25 |
| | 58 | 8,00 | 1,77 | 0,221 | 52,86 | 1,01 |
| | 59 | 7,68 | 2,10 | 0,274 | 50,26 | 1,31 |
| | M | 9,24 | 2,12 | 0,237 | 52,24 | 1,11 |
| | SD | 1,97 | 0,55 | 0,046 | 9,62 | 0,14 |

***Tabelle A7c:*** *Zellschutzparameter in der Leber von Versuch 1*

| Versuch 1 | | Leber | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | | Total GSH (µg/mg Prot.) | GSSG (µg/mg Prot.) | GSSG/TGSH | GR (mU/mg Prot.) | GST (U/mg Prot.) |
| | 61 | 7,36 | 2,03 | 0,277 | 51,00 | 0,63 |
| | 62 | 8,03 | 2,01 | 0,250 | 45,92 | 0,56 |
| | 63 | 8,01 | 1,79 | 0,223 | 55,71 | 1,04 |
| | 64 | 10,27 | 2,18 | 0,212 | 54,39 | 0,87 |
| VI | 65 | 7,67 | 1,69 | 0,220 | 45,39 | 0,98 |
| | 66 | 6,02 | 1,62 | 0,269 | 53,88 | 1,20 |
| | 67 | 7,46 | 2,07 | 0,277 | 63,47 | 1,25 |
| | 68 | 8,34 | 2,29 | 0,275 | 55,22 | 0,84 |
| | 69 | 7,75 | 2,27 | 0,292 | 46,24 | 0,59 |
| | M | 7,89 | 1,96 | 0,255 | 52,36 | 0,88 |
| | SD | 1,11 | 0,22 | 0,030 | 5,90 | 0,25 |

***Tabelle A8a:*** *Zellschutzparameter in der Leber von Versuch 2*

| Versuch 2 | | Leber | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | | Total GSH (µg/mg Prot.) | GSSG (µg/mg Prot.) | GSSG/ TGSH | GR (mU/mg Prot.) | GST (U/mg Prot.) | αGST (mU/mg Prot.) |
| | 011 | 6,15 | 0,45 | 0,073 | 28,23 | 0,91 | 178,3 |
| | 012 | 9,29 | 0,50 | 0,054 | 33,61 | 1,02 | 178,7 |
| | 013 | 8,14 | 0,50 | 0,061 | 32,59 | 0,85 | 168,3 |
| 0 | 014 | 9,46 | 0,70 | 0,074 | 32,32 | 1,00 | 127,8 |
| | 015 | 7,48 | 0,45 | 0,060 | 39,69 | 1,14 | 152,8 |
| | 016 | 10,10 | 0,52 | 0,051 | 38,44 | 0,99 | 148,2 |
| | 017 | 8,64 | 0,50 | 0,057 | 40,26 | 1,10 | 208,8 |
| | M | 8,46 | 0,52 | 0,06 | 35,02 | 1,00 | 166,1 |
| | SD | 1,24 | 0,08 | 0,01 | 4,51 | 0,10 | 24,20 |
| | 111 | 11,11 | 4,11 | 0,370 | 29,83 | 0,87 | 121,2 |
| | 112 | 11,46 | 4,75 | 0,414 | 32,13 | 1,00 | 112,1 |
| | 113 | 8,60 | 3,72 | 0,432 | 32,08 | 1,15 | 117,7 |
| I | 114 | 12,70 | 4,46 | 0,351 | 24,51 | 0,99 | 130,7 |
| | 115 | 9,42 | 3,61 | 0,384 | 29,81 | 0,85 | 97,91 |
| | 116 | 11,53 | 4,63 | 0,402 | 32,72 | 0,89 | - |
| | 117 | 8,29 | 3,35 | 0,404 | 29,24 | 0,83 | 145,7 |
| | M | 10,45 | 4,09 | 0,39 | 30,04 | 0,94 | 120,9 |
| | SD | 1,55 | 0,50 | 0,03 | 2,80 | 0,11 | 14,87 |
| | 211 | 12,41 | 3,93 | 0,317 | 34,17 | 1,16 | 115,7 |
| | 212 | 12,69 | 1,89 | *0,149* | 36,08 | 1,18 | 129,7 |
| | 213 | 11,44 | 2,47 | 0,216 | 34,69 | 1,20 | 133,4 |
| II | 214 | 14,82 | 3,82 | 0,258 | 36,48 | 0,95 | 110,2 |
| | 215 | 9,67 | 3,55 | 0,367 | 34,87 | 1,06 | 118,5 |
| | 216 | 11,17 | 4,53 | 0,405 | 34,87 | 0,90 | 171,8 |
| | 217 | 12,90 | 4,79 | 0,371 | 31,66 | 0,83 | 123,2 |
| | M | 12,16 | 3,57 | 0,32 | 34,69 | 1,04 | 128,9 |
| | SD | 1,50 | 0,97 | 0,07 | 1,56 | 0,15 | 18,99 |
| | 311 | 12,28 | 3,29 | 0,268 | 35,85 | 0,99 | 159,2 |
| | 312 | 12,21 | 3,91 | 0,320 | 35,80 | 0,90 | 147,9 |
| | 313 | 13,52 | 5,17 | 0,382 | 33,98 | 0,95 | 145,1 |
| III | 314 | 16,02 | 4,92 | 0,307 | 37,17 | 1,06 | 138,4 |
| | 315 | 10,78 | 3,75 | 0,348 | 35,89 | 0,91 | 142,5 |
| | 316 | 13,77 | 4,91 | 0,356 | 36,00 | 0,98 | 141,8 |
| | 317 | 10,57 | 4,07 | 0,385 | 38,30 | 1,16 | 147,2 |
| | M | 12,74 | 4,29 | 0,34 | 36,14 | 0,99 | 146,0 |
| | SD | 1,75 | 0,66 | 0,04 | 1,33 | 0,09 | 6,20 |

***Tabelle A8b:*** *Zellschutzparameter in der Leber von Versuch 2*

| Versuch 2 | | Leber | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | | Total GSH (µg/mg Prot.) | GSSG (µg/mg Prot.) | GSSG/ TGSH | GR (mU/mg Prot.) | GST (U/mg Prot.) | αGST (mU/mg Prot.) |
| | 411 | 11,88 | 4,20 | 0,354 | 33,80 | 0,89 | 112,1 |
| | 412 | 10,11 | 4,15 | 0,410 | 34,55 | 0,75 | 145,8 |
| | 413 | 10,91 | 4,10 | 0,376 | 35,42 | 0,96 | 170,4 |
| | 414 | 14,07 | 3,10 | *0,220* | 34,13 | 0,71 | 131,6 |
| | 415 | 10,27 | 3,32 | 0,323 | 28,63 | 0,82 | 137,7 |
| | 416 | 12,56 | 4,85 | 0,387 | 29,77 | 0,85 | 158,2 |
| | 417 | 10,29 | 3,12 | 0,303 | 32,37 | 0,98 | 142,0 |
| IV | M | 11,44 | 3,83 | 0,36 | 32,67 | 0,85 | 142,5 |
| | SD | 1,37 | 0,62 | 0,04 | 2,56 | 0,10 | 17,33 |
| | 511 | 14,63 | 5,53 | 0,378 | 33,95 | 1,16 | 171,6 |
| | 512 | 11,43 | 3,63 | 0,318 | 31,51 | 1,16 | 167,5 |
| | 513 | 15,43 | 5,53 | 0,358 | 33,67 | 1,14 | 170,1 |
| | 514 | 15,78 | 5,21 | 0,330 | 35,01 | 1,45 | 154,8 |
| | 515 | 12,42 | 3,99 | 0,321 | 29,10 | 1,06 | 147,6 |
| | 516 | 13,99 | 4,89 | 0,350 | 31,35 | 1,33 | 154,6 |
| | 517 | 12,02 | 4,22 | 0,351 | 29,58 | 0,90 | 125,0 |
| V | M | 13,67 | 4,71 | 0,34 | 32,03 | 1,17 | 155,9 |
| | SD | 1,60 | 0,71 | 0,02 | 2,26 | 0,18 | 15,16 |
| | 611 | 16,24 | 5,72 | 0,352 | 37,92 | 1,14 | 158,3 |
| | 612 | 16,09 | 5,00 | 0,311 | 34,07 | 0,94 | 183,6 |
| | 613 | 14,33 | *1,40* | *0,098* | 38,10 | 1,08 | 142,8 |
| | 614 | 18,72 | 5,42 | 0,290 | 40,44 | 1,16 | 152,3 |
| | 615 | 12,55 | 4,78 | 0,381 | 34,76 | 1,41 | 131,4 |
| | 616 | 12,11 | 4,42 | 0,365 | 34,48 | 0,92 | *96,3* |
| | 617 | 11,54 | 4,88 | 0,423 | 30,35 | 0,96 | 125,5 |
| VI | M | 14,51 | 5,04 | 0,35 | 35,73 | 1,09 | 149,0 |
| | SD | 2,44 | 0,47 | 0,04 | 3,34 | 0,17 | 19,13 |

***Tabelle A9a:*** *Zellschädigungsparameter in der Leber von Versuch 1*

| Versuch 1 | | Leber | | |
|---|---|---|---|---|
| Gruppe | | TBA-RS (nmol/g FM) | PC (nmol/mg Prot.) | γ-GS (U/mg Prot.) |
| | 01 | 111,7 | 0,98 | 5,14 |
| | 02 | 110,8 | 1,33 | 10,23 |
| | 03 | 122,8 | 2,66 | 13,15 |
| | 04 | 110,1 | 1,80 | 10,37 |
| 0 | 05 | 128,3 | 1,04 | 4,50 |
| | 06 | 109,4 | 1,23 | 4,57 |
| | 07 | 117,9 | 1,94 | 4,94 |
| | 08 | 116,4 | 1,02 | 5,28 |
| | 09 | 109,1 | 1,65 | 4,84 |
| | M | 115,9 | 1,52 | 7,00 |
| | SD | 6,78 | 0,56 | 3,30 |
| | 11 | 92,22 | 0,79 | 9,68 |
| | 12 | 85,50 | 1,36 | 14,19 |
| | 13 | 71,81 | 0,75 | 7,72 |
| | 14 | 88,20 | 1,66 | 8,19 |
| I | 15 | 79,11 | 2,80 | 5,96 |
| | 16 | 92,94 | 0,76 | 6,69 |
| | 17 | 101,50 | *3,94* | 9,62 |
| | 18 | 93,52 | 3,02 | 6,32 |
| | 19 | 98,57 | 1,21 | *19,86* |
| | M | 89,26 | 1,54 | 8,55 |
| | SD | 9,35 | 0,91 | 4,53 |
| | 21 | 57,06 | 2,37 | 7,69 |
| | 22 | - | - | - |
| | 23 | 54,96 | 0,99 | 6,23 |
| | 24 | 66,96 | 0,77 | *17,23* |
| II | 25 | 58,84 | *3,00* | 7,58 |
| | 26 | 51,64 | 1,58 | 7,95 |
| | 27 | 75,73 | 1,82 | 8,55 |
| | 28 | 70,50 | 0,94 | 9,84 |
| | 29 | 73,64 | 2,35 | 8,17 |
| | M | 63,67 | 1,54 | 8,00 |
| | SD | 9,18 | 0,67 | 3,42 |

***Tabelle A9b:*** *Zellschädigungsparameter in der Leber von Versuch 1*

| Versuch 1 Gruppe | | Leber TBA-RS (nmol/g FM) | Leber PC (nmol/mg Prot.) | Leber γ-GS (U/mg Prot.) |
|---|---|---|---|---|
| | 31 | 50,74 | 1,53 | 14,57 |
| | 32 | 54,80 | 1,42 | 7,02 |
| | 33 | 51,44 | 1,71 | 9,00 |
| | 34 | 52,05 | 2,63 | 9,81 |
| III | 35 | 52,53 | 1,50 | 10,16 |
| | 36 | 50,69 | 2,56 | 6,86 |
| | 37 | 38,65 | 0,73 | 5,32 |
| | 38 | 45,63 | 1,63 | 8,84 |
| | 39 | 48,05 | 1,19 | 14,36 |
| | M | 49,40 | 1,68 | 9,55 |
| | SD | 4,81 | 0,64 | 3,19 |
| | 41 | 33,18 | 1,17 | 5,36 |
| | 42 | 45,63 | 0,72 | 15,94 |
| | 43 | 45,63 | 0,98 | 9,29 |
| | 44 | 38,08 | 0,99 | *26,34* |
| IV | 45 | 29,72 | 1,68 | 15,32 |
| | 46 | 44,83 | 1,05 | 9,58 |
| | 47 | 35,98 | 0,84 | 4,11 |
| | 48 | 39,30 | 0,61 | 7,13 |
| | 49 | 29,13 | 1,03 | 13,03 |
| | M | 37,94 | 1,01 | 9,97 |
| | SD | 6,51 | 0,30 | 6,86 |
| | 51 | 16,06 | 0,86 | 7,74 |
| | 52 | 16,03 | 1,34 | 8,42 |
| | 53 | 28,73 | 1,04 | 3,65 |
| | 54 | 25,02 | 0,80 | 3,67 |
| V | 55 | 25,42 | 0,84 | 5,97 |
| | 56 | 23,56 | 1,68 | 3,11 |
| | 57 | 21,42 | 1,29 | 5,20 |
| | 58 | 22,08 | 0,63 | 3,79 |
| | 59 | 21,96 | 1,71 | 8,09 |
| | M | 22,25 | 1,13 | 5,51 |
| | SD | 4,17 | 0,39 | 2,12 |

***Tabelle A9c:*** *Zellschädigungsparameter in der Leber von Versuch 1*

| Versuch 1 | | Leber | | |
|---|---|---|---|---|
| Gruppe | | TBA-RS (nmol/g FM) | PC (nmol/mg Prot.) | γ-GS (U/mg Prot.) |
| | 61 | 33,09 | 1,04 | 10,43 |
| | 62 | 19,74 | 1,35 | 11,53 |
| | 63 | 22,94 | 1,29 | 12,66 |
| | 64 | 32,61 | 1,83 | 6,08 |
| VI | 65 | 29,79 | 1,56 | 9,50 |
| | 66 | 27,58 | 1,57 | 8,57 |
| | 67 | 26,94 | 1,70 | 5,00 |
| | 68 | 25,56 | 1,80 | 6,24 |
| | 69 | 25,52 | 0,72 | 10,21 |
| | M | 27,09 | 1,43 | 8,91 |
| | SD | 4,33 | 0,37 | 2,64 |

***Tabelle A10:*** *Genexpression der αGST A5, γ-Glutamylcysteinsynthetase und γ-Glutamyltranspeptidase ermittelt durch Microarray-Screening in Versuch 1*

| **Gen** | **Auswertung** | **x-fache Veränderung gegenüber Kontrolle Se 0** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Name** | **Gruppe** | **I** | **II** | **III** | **IV** | **V** | **VI** |
| αGST A5 (S 82820) | Microarray | ↓1,97 | ↓2,8 | ↓1,8 | ↓1,64 | - | - |
| γ-Glutamylcysteinsynthetase (J 051811) | Microarray | →1,0 | ↓1,27 | ↓1,1 | ↓1,4 | - | - |
| γ-Glutamyltranspeptidase (NM 0538401) | Microarray | ↑1,1 | ↑1,8 | ↑1,2 | ↑1,1 | - | - |

Pfeile zeigen die Richtung der Expressionsänderung: ↑ heraufreguliert, ↓ herabreguliert, → keine veränderte Regulation

## MWG-BIOTECH AG (Ebersberg, http://www.mwg-biotech.com/)

## Microarray Analyse: Probenvorbereitung und Auswertung

### Markierung und Umschreiben der RNA

Zunächst wurde die aufbereitete RNA (100 µg Total RNA) in 17,5 µl RNase-freiem Wasser gelöst und mit 1,0 µl Oligo-D($T_{15,20}$)-Primer (1,0 µg/µl) versetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz 10 min bei 65°C und weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweiminütigem Abkühlen auf Eis wurden folgende Reaktionskomponenten hinzupipettiert: 8,0 µl 5x RT Reaktionspuffer (Superscript II Kit, Invitrogen), 4,0 µl dNTP- Mastermix, 4,0 µl Cy3-dCTP oder Cy5-dCTP (1 mM; NEN oder Amersham Pharmacia), 4,0 µl DTT (0,1 M, Superscript II Kit, Invitrogen) und 1,5 µl Superscript II (200 U Reverse Transkriptase, Invitrogen). Im Anschluss wurden die Proben vorsichtig gemischt, abzentrifugiert und weitere 2 h bei 39°C inkubiert. Die Zugabe von 10 µl NaOH (1 M) beendete die Reaktion. Die Proben wurden daraufhin weitere 10 min bei 65°C inkubiert und durch hinzupipettieren von 10µl HCl (1M) und 200 µl TE-Puffer (10 mM TRIS, 0,5 mM EDTA, pH 7,5) neutralisiert. Überschüssige Nukleotide, Farbstoff und Primer wurden mit Hilfe des PCR Purification Kit´s der Firma Qiagen entfernt. Die cDNA wurde daraufhin in RNase freiem Wasser eluiert. Nach der photometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration wurde ca. 1 µg der mit Cy3 markierten Probe mit 1 µg der mit Cy5 markierten Probe versetzt. Die so entstandene Lösung wurde abgedampft und das entstandene Pellet in 250 µl eines Hybridisierungspuffer auf Salzbasis gelöst.

### Hybridisierung und Waschschritte

In einem ersten Schritt wird der Hybridisierungspuffer auf Salzbasis 10 min auf 42°C und die markierte cDNA 3 min auf 95°C erhitzt. Für den MWG Rat 10K Array ist ein Hybridisierungsvolumen von 250µl vorgesehen. Die so gelösten Proben wurden im Anschluss maximal 3 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert.
Daraufhin wurde mit Hilfe des Array-Finders der Zielbereich auf dem Objektträger gesucht und ein Rahmen (Gene Frame®) aufgebracht. Anschließend wurde die Schutzfolie des Rahmens abgelöst und die 250 µl der Lösung aus markierter cDNA und Hybridisierungspuffer auf den Objektträger gebracht. Dann wurde der Rahmen mit einer Polyesterfolie erneut verschlossen und die Lösung durch Druckausübung gleichmäßig verteilt. Hierbei wurde überschüssige Lösung entfernt und die Folie konnte endgültig befestigt und der Rahmen somit verschlossen werden. Im Anschluss wurden die Arrays in eine nasse Hybridisierungskammer gesetzt und die Hybridisierungskammer mit den Arrays, in einem Schüttler, bei 42°C 16-24 h inkubiert. Nach der Hybridisierung wurden die Rahmen entfernt und die Arrays gewaschen. Die Waschschritte wurden in einem Anfärbeglas für Objektträger bei Raumtemperatur ausgeführt. Hierzu wurden 200 ml des auf 30°C vorgewärmten Waschpuffers zu dem Array gegeben und dieser unter vorsichtigem Schwenken gewaschen. In den drei Waschschritten wurden folgende Puffer benutzt:

1. 2x SSC, 0.1% SDS
2. 1x SSC (0,015 M Natriumcitrat, 0,15 M NaCl, pH 7,0)
3. 0.5x SSC

Anschließend wurden die Arrays in einem Spitzboden Zentrifugenröhrchen bei Raumtemperatur mittels Zentrifugation (500 x g) getrocknet.

### Produkt und Qualitätssicherung

Die Produkt und Qualitätssicherung der MWG Microarrays erfolgt zum einen durch ein Scanning, zur Überprüfung der Probenposition und zum anderen durch die Hybridisierung mit markierten „random oligonucleotides“ zur Kontrolle der kovalenten Bindung der Proben an der Microarrayoberfläche. Des Weiteren wurde durch den Einsatz von genspezifischer Arabidopsis Kontroll-Oligonucleotide eine Probenverschleppung während der Vorbereitung bzw. des Spotting-Prozesses vermieden und die korrekte Probenposition garantiert.

### Bildauswertung

Die Expressionsmuster wurden mit Hilfe des Affymetrix 428 Array Scanners ermittelt. Dieser Scanner ist mit zwei Lasern ausgestattet, welche bei 532 bzw. 632 nm die fluoresenzfarbstoffmarkierten (Cy3, Cy5) cDNA Proben anregen. Die Expressionssignale wurden von dem Photomultiplier des Scanners erfasst und als Falschfarbenbild dargestellt. Hierbei wurde jeder Microarray bei einer Mehrzahl von Amplifikationseinstellungen gescannt.
Die verschiedenen Bilddaten jedes Arrays wurden in das MAVI Pro 2.6.0 Programm von MWG eingelesen und nur diejenigen Werte berücksichtigt, welche weder eine Übersättigung noch zu geringe Intensitäten aufwiesen. Daraufhin ermittelte das Programm aus den verbliebenen Werten mittels linearer Regression anhand der genspezifischen Amplifikate die Intensitäten und drückte diese als Dezimalzahl aus. Nach der Normalisierung der Daten konnte die Differenz der Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe auf dem Microarray als Quotient ausgedrückt werden.

# Danksagung

---

*Im Lichte bereits erlangter Erkenntnis erscheint das glücklich Erreichte fast wie selbstverständlich.*

*Albert Einstein*

---

Sehr herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Josef Pallauf für die Überlassung des Themas und seine freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Edgar Weigand bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Andreas Müller für seine immer gewährte Diskussions- und Hilfsbereitschaft, während der Durchführung der hier vorliegenden Studien sowie die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Erika Most, Frau Anja Marx, Frau Nicole Krämer, Frau Susanne Breitstadt, Frau Frauke Frank, Frau Martina Schneider, Herrn Herbert Kirch und Herrn Helmut Henzel für die Hilfe bei den zahlreichen Analysen. Frau Silke Hees, Frau Annika Fischer, Herrn Marco Jäger und Herrn Steffen Brückel danke ich für die Unterstützung bei der Diätherstellung und der Betreuung der Tiere während der Versuche.

Herrn Dr. Manfred Hollenhorst danke ich für seine Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Versuchsdaten.

Meiner Diplomandin Sandra Weinland und Bachelorstudentin Constance Reif möchte ich für ihre tatkräftige Unterstützung und engagierte Mitarbeit bei den Tierversuchen und Laboranalysen danken.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern am Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie möchte ich für die schöne Zeit bedanken.

Mein Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden für deren Anteilnahme und Unterstützung. Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Vater für die Durchsicht des Manuskripts, die motivierenden Worte und die konstruktiven Anregungen bedanken.

# Lebenslauf

## Astrid Christina Bosse

Geburtsdatum: 02. Dezember 1977

Geburtsort: Hofheim/Ts.

### Hochschulbildung

| | |
|---|---|
| Seit Mai 2003 | wissenschaftliche Mitarbeiterin und Doktorandin am Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen |
| Oktober 1998 – April 2003 | Studium der Agrarwissenschaften an der Justus-Liebig-Universität, Gießen |

### Schulbildung

| | |
|---|---|
| Juni 1997 | Abitur an der Immanuel-Kant-Schule in Kelkheim/Ts. |
| August 1994 - Juni 1997 | Immanuel-Kant-Schule, gymnasiale Oberstufe des Main-Taunus-Kreises in Kelkheim/Ts. |
| Januar 1990 - Juli 1994 | Eichendorffschule, Gesamtschule des Main-Taunus-Kreises in Kelkheim/Ts., gymnasialer Zweig |
| August 1989 - Dezember 1989 | Main-Taunus-Gymnasium in Hofheim/Ts. |
| Dezember 1983 - Juni 1989 | High Bridge Elementary School High Bridge NJ, USA<br>High Bridge Middle School High Bridge NJ, USA |

### Praktische Erfahrungen

| | |
|---|---|
| August 2001 - Oktober 2001 | Landwirtschaftszentrum Haus Düsse, 59507 Bad Sassendorf/Ostinghausen |
| Februar 1999 - April 1999 | Biolandhof Jürgen Schaar, 65843 Sulzbach/Ts. |
| Juli 1997 - Juli 1998 | Ausbildung an der UVM Morgan Horse Farm, University of Vermont, in Weybridge, VT USA in Pferde-Training und Pferde-Management |