

**„Cholesterol als negativer post-transkriptioneller Regulator
der Selenoprotein-Expression“**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
„Doktor in Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

vorgelegt von
Martha Tews

Mainz, 2019

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 19.08.2019

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Doktorarbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Mainz, Juni 2019

Martha Tews

„Sobald der Geist auf ein Ziel gerichtet ist,

kommt ihm vieles entgegen.“

Johann Wolfgang von Goethe

Meinem Sohn Elias gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
1 Einleitung	1
1.1 Cholesterol.....	1
1.1.1 Struktur und Funktion von Cholesterol.....	1
1.1.2 Intrazelluläre Regulation der Cholesterolsynthese	4
1.2 Wichtige biochemische Effektor-Mechanismen des Cholesterols und seiner Metaboliten	7
1.3 Cholesterol und sein Einfluss bei kardiovaskulären Erkrankungen	11
1.4 Assoziation des Cholesterols mit anderen Krankheiten	13
1.5 Strategien zur Beeinflussung des Cholesterolspiegels und zur generellen Prävention von Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems	14
1.5.1 Lebensstil und Ernährung	14
1.5.2 Arzneimitteltherapie	15
1.6 Fragestellung.....	19
2 Materialien.....	20
2.1 Puffer und Lösungen.....	20
2.1.1 Allgemein verwendete Puffer und Lösungen:	20
2.1.2 Proteinanalytik	21
2.1.3 Agarose-Gel-Elektrophorese.....	22
2.2 Oligonucleotide.....	23
2.3 Mausmodelle.....	23
2.4 Klonale Zelllinien	25
2.5 Lösungen und Medien für die Zellkultur	25
2.6 Antikörper.....	26
2.7 Spezielle Chemikalien	26
2.8 Geräte.....	27

3	Methoden	28
3.1	Zellkultur	28
3.1.1	Bestimmung von Zellzahlen	28
3.1.2	Kryokonservierung von Zellen	29
3.1.3	Behandlung von humanen Leberzellen.....	29
3.1.4	Experimente mit humanen T-Lymphozyten (Jurkat-Zellen).....	29
3.2	Cholesterolbestimmung	30
3.3	RNA-Isolierung	30
3.4	cDNA-Synthese, reverse Transkription.....	31
3.5	Real-Time RT-PCR	32
3.5.1	Überprüfung der Produkte der qPCR mit einer Agarose- Gelelektrophorese	33
3.6	Protein-Analyse	33
3.6.1	Protein-Isolation.....	33
3.6.2	Protein-Quantifizierung	34
3.6.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
3.6.4	Western-Blot	35
3.6.5	Nachweis von Proteinen nach Blotting mittels Antikörpern (Immunoblot)	36
3.7	Präparation von Mausgeweben.....	36
3.8	Statistische Auswertung.....	36
4	Ergebnisse	38
4.1	Auswirkungen von Oxysterolen auf die Selenoprotein-Expression in klonalen Hepatozyten	38
4.1.1	Selenoprotein-Expression nach Oxysterolbehandlung	38
4.1.2	Auswirkung der Behandlung mit 22- und 25-Hydroxycholesterol auf die transkriptionelle Regulation von Selenoproteinen.....	41
4.1.3	Selenoprotein-Expression nach Oxysterolbehandlung in einem Serum- freien Opti-MEM-Medium.	42
4.2	Einfluss von Oxysterolen auf die Selenoprotein-Expression in klonalen T- Lymphozyten	43
4.3	Transkriptionelle Effekte einer Inkubation mit 22- und 25-Hydroxycholesterol....	46

4.4	Analyse der Selenoprotein-Expression in transgenen Mausmodellen der Hypercholesterolämie	48
4.4.1	Messung des Blut- und Leber-Cholesterols von ApoE- und LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen	49
4.4.2	Untersuchung der Selenoprotein- und HMG-CoA-Reduktase-Expression auf transkriptioneller Ebene	52
4.4.3	Analyse anderer Gewebearten	53
4.5	Untersuchungen in DIO-Mäusen, einem Modell für ernährungsbedingte Adipositas	56
5	Diskussion	61
5.1	Unterschiedliche Mechanismen der Beeinflussung der Selenoprotein-Synthese durch Oxysterole in Hepatozyten und T-Lymphozyten	61
5.2	Spezifisch veränderte Selenoprotein-Expression in der Leber in Mausmodellen der Hypercholesterolämie	68
5.3	Inhibition der Selenoprotein-Synthese durch Cholesterol als mögliche Erklärung negativer Auswirkungen erhöhter Cholesterolspiegel im Menschen	72
6	Zusammenfassung	84
7	Summary	86
8	Literaturverzeichnis	88
9	Eigene Publikationen/Posterpräsentationen	105
10	Danksagung	106
11	Lebenslauf	107

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Der Mevalonatweg.....	2
Abbildung 2.	Aufbau von Low-Density-Lipoproteinen	3
Abbildung 3.	Regulationsmechanismen der Cholesterol-Biosynthese	5
Abbildung 4.	Regulationsmechanismen der Cholesterol-Biosynthese II	6
Abbildung 5.	Wirkungsmechanismus von Statinen.....	16
Abbildung 6.	Western-Blot-Analyse der Selenoproteine nach der Inkubation mit vier unterschiedlichen Oxysterolen in HepG2-Zellen.....	40
Abbildung 7.	RT-PCR-Analyse von HepG2-Zellen nach der Inkubation mit 25µM 22-HC (A) und 25-HC (B)	42
Abbildung 8.	Western-Blot-Analyse der HepG2-Zellen nach Inkubation mit 25-HC.	43
Abbildung 9.	Western-Blot-Analyse der Selenoproteine nach der Behandlung mit Oxysterolen in Jurkat-Zellen.....	45
Abbildung 10.	m-RNA-Spiegel der untersuchten Gene in Jurkat-Zellen nach der Behandlung mit 25 µM 22-(A) bzw. 25-HC (B).	47
Abbildung 11.	Einfluss der Oxysterole auf die HMGCR-Expression in Jurkat-Zellen.....	48
Abbildung 12.	Cholesterolgehalt in Leber (A) und Blut (B) von ApoE- und LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen	50
Abbildung 13.	Western-Blot-Analyse (A) und densimetrische Auswertung (B) der Selenoproteine in den Lebern von Mäusen der Genotypen ApoE- und LDL-Rezeptor-Knockout, erste Präparation.....	51
Abbildung 14.	Western-Blot-Analyse der Selenoproteine in den Lebern von Mäusen der Genotypen ApoE- und LDL-Rezeptor-Knockout, zweite Präparation.	52
Abbildung 15.	Analyse der mRNA-Spiegel der Selenoproteine in den Lebern von ApoE- und LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen.	53
Abbildung 16.	Cholesterolspiegel in der Niere in ApoE- und LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen.....	54
Abbildung 17.	Analyse der GPx1 Expression in Nieren von ApoE- und LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen.....	54
Abbildung 18.	Die Cholesterolspiegel in den Hoden von ApoE- und LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen.....	55

Abbildung 19.	Western-Blot-Analyse der Selenoproteine in den Hoden von ApoE- und LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen.....	55
Abbildung 20.	Cholesterolbestimmung in den Lebern von DIO-Mäusen.....	57
Abbildung 21.	Expression von GPx1 und Gpx4 in den Lebern von DIO-Mäusen (A) und densitometrische Auswertung davon (B).....	58
Abbildung 22.	Vergleich der Expression von SelS und SelW in DIO- und transgenen Mäusen.....	60
Abbildung 23.	Klassische negative Rückkopplung der Cholesterolsynthese durch 25-Hydroxycholesterol.....	64
Abbildung 24.	Denkbare Regulationsmechanismen der Cholesterolsynthese durch 22-Hydroxycholesterol.....	67
Abbildung 25.	Cholesterol vermittelte Regulation der tRNA-Isopentenyltransferase Trit1 (hypothetisch).....	69
Abbildung 26.	Regulation der Selenoprotein-Synthese unter Einfluss von Cholesterol und Statinen	81
Abbildung 27.	Modell für die gemeinsame Wirkung von Statinen und Cholesterol auf die Selenoprotein-Synthese.....	81
Abbildung 28.	Molekulare Wege der Ferroptose-Regulation.....	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	Selenoproteine und Funktionsbeschreibung	10
Tabelle 2.	Verwendete Primer	23
Tabelle 3.	Geräteverzeichnis.....	27
Tabelle 4.	Körpergewichte der DIO-Mäuse nach 20 Wochen auf der entsprechenden Diät.....	56

Abkürzungsverzeichnis

22-HC	22-Hydroxycholesterol
24-HC	24-Hydroxycholesterol
25-HC	25-Hydroxycholesterol
27-HC	27-Hydroxycholesterol
A37	Adenin 37
ACAT	Acetyl-CoA-Cholesterol-Acyltransferase
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ApoA /B /E	Apolipoprotein A /B /E
ApoER2	Apolipoprotein E Rezeptor-2
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
CETP	Cholesterylester Transfer Protein
COPII	coat protein II
CoQ	Coenzym Q
Ctrl	Kontrolle
CuSO ₄	Kupfersulfat
Cys	Cystein
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DIO	Iodothyronin Deiodinase
DIO	Diet induced obesity (Adipositasmausmodell)
DMEM	Dulbecco's modified Eagles's medium
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Dithio bis-(2-nitrobenzoesäure)
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFsec	Translations-Elonngationsfaktor
eIF4a3	Initiationsfaktor 4a3
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	fetal calf serum, fötales Kälberserum
FH	familiäre Hypercholesterolämie
g	Gramm

GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion (reduziert)
GSH-R	Glutathionreduktase
GSSG	Glutathion (oxidiert)
h	hour(s), Stunde(n)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HDL	high density lipoprotein, Lipoprotein hoher Dichte
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HMG	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HMGCR	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
i6A	Isopentenyladenosin
IPP	Isopentenylpyrophosphat
kb	Kilobasen (1000 Basenpaare)
kDa	Kilodalton
LCAT	Lecithin:Cholesterol-Acyltransferase
LDL	low density lipoprotein, Lipoprotein geringer Dichte
LDL-R	LDL-Rezeptor
M	Molar
MCD	Methyl-β-Cyclodextrin
mcm5U(m)	5-Methylcarboxymethyluridin-(2'-O-methylribose)
Met	Methionin
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
μg	Mikrogramm
μM	Mikromolar
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-(phosphat)
NaOH	Natriumhydroxid

nM	Nanomolar
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
RNA	ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
RT	reverse transcription, reverse Transkription
s	Sekunde
S1P / S2P	Site-1 protease / Site-2 protease
SBP	SECIS-binding protein
SCAP	SREBP-cleavage activating protein
SDS	sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
Se	Selen
Sec	Selenocystein
SECIS	selenocysteine insertion sequence
SecS	Selenocystein-Synthase
Sec-tRNA	Selenocystein-tRNA
SelP	Selenoprotein P
Ser	Serin
SPS	Selenophosphat-Synthetase
SRE	sterol regulatory element
SREBP	sterol regulatory element binding protein
TBS	tris buffer saline, Tris-gepufferte Salzlösung
tBuOOH	tert-Butylhydroperoxid
Trit	tRNA-Isopentenyltransferase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
tRNA[Ser/Sec]	Selenocystein-tRNA
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxin-Reduktase
U, unit(s),	Einheit(en)
U34	Uracil 34
UGA	Uracil – Guanin – Adenin

V	Volt
VLDL	very low density lipoprotein, Lipoprotein sehr geringer Dichte
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Cholesterol

1.1.1 Struktur und Funktion von Cholesterol

Cholesterol ist ein essentielles Molekül für das Überleben und die Proliferation einer Zelle. Es steuert die Fluidität der Membran von tierischen Zellen und die Funktion von Membranproteinen.

Bei dem Molekül handelt es sich um einen polyzyklischen Alkohol aus 27 C-Atomen. Die Hydroxylgruppe des Cholesterols interagiert elektrostatisch mit den polaren Gruppen von sauren Phospho- und Sphingolipiden, während die Kohlenwasserstoffkette in der Membran longitudinal zu den nicht-polaren Fettsäuren eingebettet ist (Zarate et al. 2016). Die Biosynthese von Cholesterol findet hauptsächlich im Cytoplasma und im endoplasmatischen Retikulum statt. Als Substrat gilt Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA), das dem Körper aus mehreren Quellen, z.B. der β -Oxidation der Fettsäuren zur Verfügung steht.

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Synthese ist die Reduktion von β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA) durch die HMG-CoA-Reduktase (Abb. 1). Aus dem Zwischenprodukt Mevalonat entsteht nach Phosphorylierung und Decarboxylierung das aktive Isopren Isopentenylidiphosphat-ein C5-Molekül-im weiteren Verlauf der Synthese wird aus sechs Isopren-Einheiten das C30-Molekül Squalen gebildet (Miziorko 2011). Durch Oxidation, Umlagerung einer Methylgruppe und Hydroxylierung am C3-Atom entsteht dann zunächst das zyklische Lanosterin. Dieses wird durch die Abspaltung von drei Methylgruppen und die Umlagerung einer Doppelbindung in Cholesterol, ein C27-Molekül, umgewandelt.

Cholesterol selbst kann wegen seiner Grundstruktur schlecht gespeichert werden. Deswegen wird Cholesterol durch zwei verschiedene Enzyme verestert: Acyl-CoA-Cholesterol-Acyltransferase und Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase.

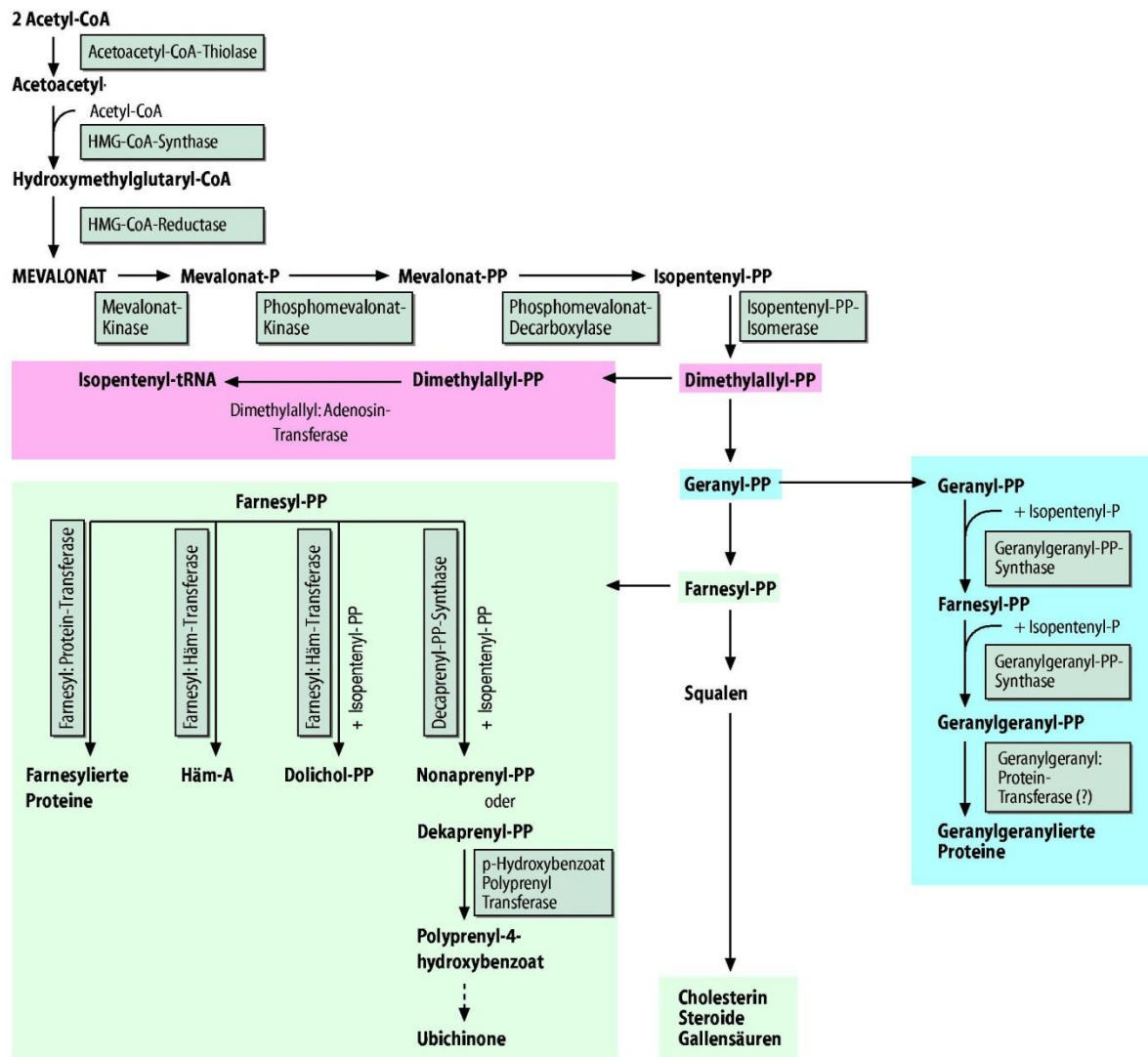


Abbildung 1. Der Mevalonatweg

Der Mevalonatweg ist Beginn der Cholesterolsynthese und liefert ausgehend von Acetyl-CoA Isoprenoide (Löffler und Petrides, 7. Auflage, Springer-Verlag). Dem Isopren Isopentenylpyrophosphat (IPP) kommt eine große Bedeutung im Stoffwechsel, weit über das Cholesterin hinaus, zu. Es ist unter anderem Vorläufer für die Synthese von Dolichol, Ubichinon und prenilierten Proteine sowie jenseits des Menschen auch für die Synthese von Vitamin E, vielen Duftstoffen, ätherischen Ölen und verschiedenen pharmazeutischen Substanzen (Liao et al. 2016). Ebenfalls wird Isopentenylpyrophosphat in kontrollierter Weise für die post-transkriptionelle Modifikation der Selenocystein-tRNA verwendet. Damit spielt das im Mevalonat-Weg gebildete IPP eine wichtige Rolle in der Synthese der Selenoproteine.

Aufgrund seiner Wasserunlöslichkeit wird Cholesterin zum Transport im Blut in wasserlösliche Lipoproteine (VLDL, IDL, LDL, HDL) eingebaut.

Die Ära der Lipoproteine fing im Jahre 1955 an, als der Physiker John Gofman die Plasma-Lipoproteine mittels einer Ultrazentrifugation nach ihrer Dichte auftrennte (Gofman et al. 1954). Die beobachtete variable Zusammensetzung entspricht auch der Funktion der Lipoproteine, da sie Lipide aufnehmen, befördern und abgeben. Am Aufbau der Lipoproteine sind Cholesterin, Triglyceride, Phospholipide und Proteine, sogenannte Apolipoproteine, beteiligt (Abb. 2). Triglyceridreich sind Chylomikronen und VLDL (very low density lipoprotein;

0,95-1,0006 g/ml). Chylomikronen transportieren Triglyceride aus der Nahrung in die Leber. VLDLs bringen endogen gebildete Triglyceride zum Fettgewebe, der Rest wird durch eine Lipoprotein-Lipase hydrolysiert, dadurch entstehen IDL (intermediate-density lipoprotein; 1,006-1,019 g/ml) und LDL (low-density lipoprotein; 1,019-1,063 g/ml). Die Triglyceride in den Chylomikronen (<0,95 g/ml) werden ebenfalls durch eine Lipase zur Chylomikronen-Remnant umgewandelt. Cholesterolreich sind LDL und in geringerem Maße HDL (high-density lipoprotein; > 1,063 g/ml) (Goldstein und Brown 2015).

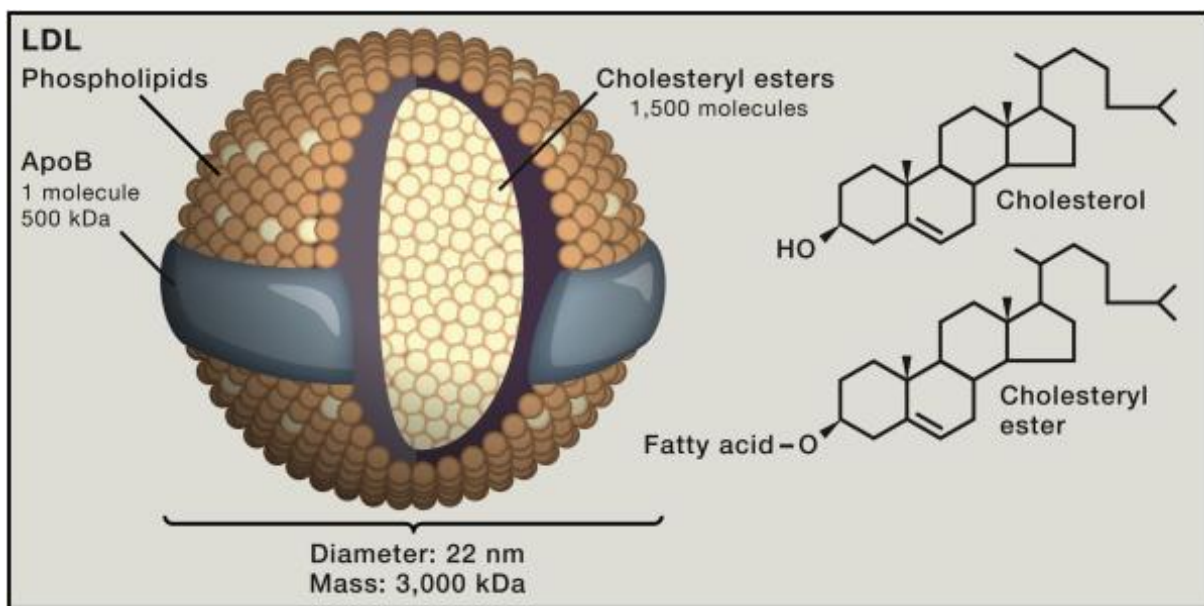


Abbildung 2. Aufbau von Low-Density-Lipoproteinen

LDL sind sphärische Partikel mit einer Größe von 22 nm. Sie bestehen zu etwa aus 50 % Cholesterol und zu gleich großen Anteilen aus Phospholipiden und Lipoproteinen. Cholesterol wird in LDL überwiegend in Form von Cholestereestern transportiert und von Phospholipiden umhüllt. Jedes LDL wird von einem Apolipoprotein B umhüllt, was als Ligand für die LDL-Rezeptoren dient (Goldstein und Brown 2015).

Mit steigendem Proteinanteil nimmt die Dichte der Lipoproteine zu, die Größe der Partikel verhält sich invers. Die kleinsten Aggregate sind HDL und haben eine andere Funktion als LDL. Sie nehmen Cholesterol in der Peripherie auf und transportieren es zur Leber, wo es metabolisiert und ausgeschieden wird. HDL-Partikel werden aufgrund dieser Eigenschaften eine Reihe antiatherogener Eigenschaften zugeschrieben (Eisenberg 1984).

Die zelluläre Aufnahme der LDL-Partikel erfolgt über LDL-Rezeptoren, die auf der Zelloberfläche lokalisiert sind. Die Rezeptoren erkennen ihre Liganden am Apolipoprotein. LDL enthält Apolipoprotein B100, das der LDL-Rezeptor erkennt und bindet. Der Rezeptor-LDL-Komplex wird durch Endozytose aufgenommen und fusioniert mit einem Endosom, dissoziiert dort, und in einem Recyclingvesikel kehrt der Rezeptor zur Zellmembran zurück (Goldstein und Bown 2015).

Die Synthese des LDL-Rezeptors ist einer Regulation durch Rückkopplung unterworfen (Goldstein und Brown 2015). Der Anstieg des Cholesterolgehaltes in der Zelle führt zur Repression der Transkription von LDL-Rezeptoren und HMG-CoA-Reduktase; ein intrazellulärer Cholesterolmangel bewirkt das Umgekehrte (Goldstein und Brown 2015).

1.1.2 Intrazelluläre Regulation der Cholesterolsynthese

Die intrazelluläre Cholesterolsynthese ist ein komplexer Prozess und wird über mehrere Regulatoren kontrolliert (Goldstein und Brown 1984). Säugetiere haben ein Netzwerk entwickelt, um eine optimale Versorgung der Zelle mit Cholesterol zu gewährleisten (Maxfield und Van Meer 2010). In die Regulation der Cholesterolsynthese sind viele Proteine involviert, die entweder selbst durch Cholesterol und seine Metabolite oder durch Zwischenprodukte der Synthese reguliert werden. Während der Hauptanteil des zellulären Cholesterols sich in der Plasmamembran befindet, sitzt die Maschinerie für die Cholesterol-Homöostase im endoplasmatischen Retikulum, unter anderen SREBPs (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins), Transkriptionsfaktoren und damit assoziierte regulatorische Proteine (Abb. 3). Es gibt zwei Isoformen des SREBPs. Die Isoform SREBP-2 reguliert primär die Gene der Cholesterol-Homöostase und der LDL-Rezeptoren (Hua et al. 1993); SREBP-1 ist in die Fettsäuresynthese involviert. Ist der Sterolbedarf in der Zelle gedeckt, wird der sogenannte SREBP-SCAP-Komplex durch ein weiteres Transmembranprotein, genannt Insig, in der ER-Membran gehalten (Abb. 3). SCAP ist ein Eskortprotein, aber fungiert gleichzeitig als Sterolsensor. Dagegen binden Oxysterole wie 25-Hydroxycholesterol direkt an Insig (Adam et al. 2004). Ist die Cholesterolkonzentration in der Zelle niedrig (Abb. 4), löst sich der SCAP/SREBP-Komplex, wird durch SCAP zum Golgi-Apparat gebracht und SREBP wird durch zwei Proteasen, Site-1-Protease und Site-2-Protease, prozessiert (Radhakrishnan et al. 2008). Die aktive N-Domäne gelangt dann in den Zellkern und bindet an SRE-Sequenzen der Targetgene, was zur Hochregulation der Transkription von Genen, die für Synthese (HMG-CoA-Reduktase) und Aufnahme (LDL-Rezeptoren) von Cholesterol essentiell sind, führt.

Der SREBP-Signalweg wird ausgeschaltet, wenn die Cholesterolkonzentration im Endoplasmatischen Retikulum um 5 % den Gesamtlipidgehalt übersteigt (Radhakrishnan et al. 2008).

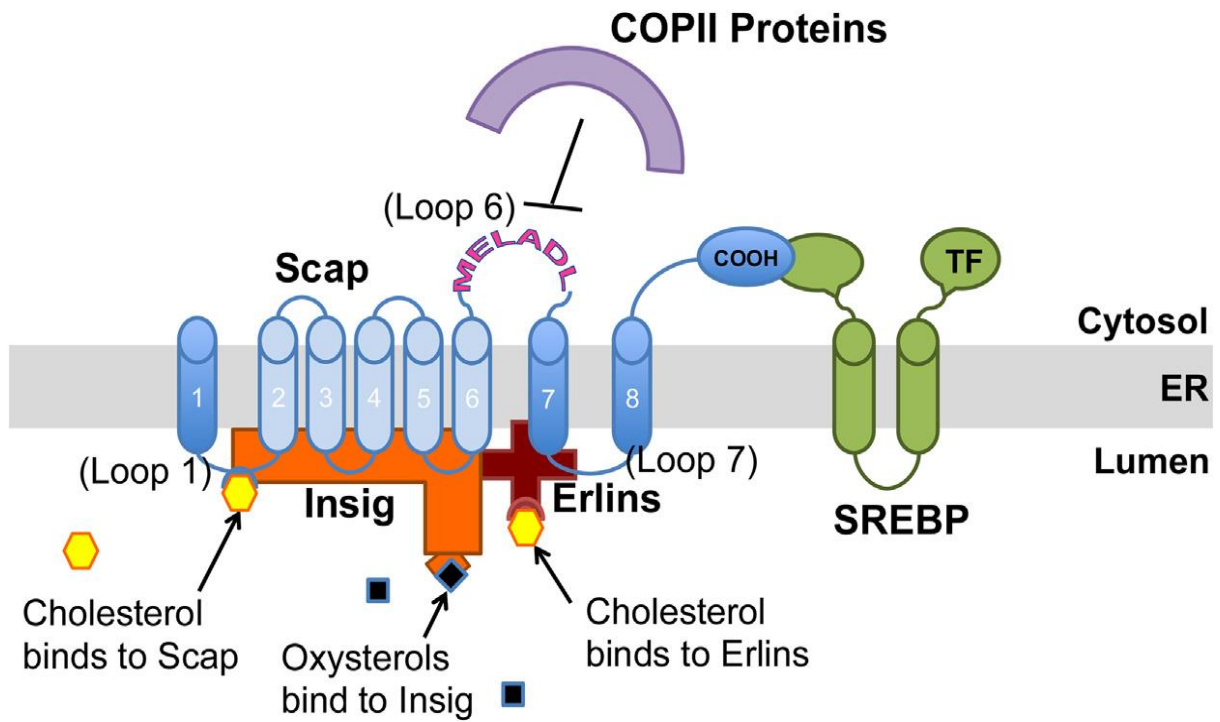


Abbildung 3. Regulationsmechanismen der Cholesterolsynthese

Bei hohen Cholesterolkonzentrationen in der Zelle bindet ein SREBP2-SCAP-Komplex an ein Insig (insulin induced gene)-Protein und fixiert auf diese Weise das SREBP2. Es findet kein COPII-Vesikel-Transport statt. Damit unterbleibt die Induktion der Zielgene (Howe et al. 2016).

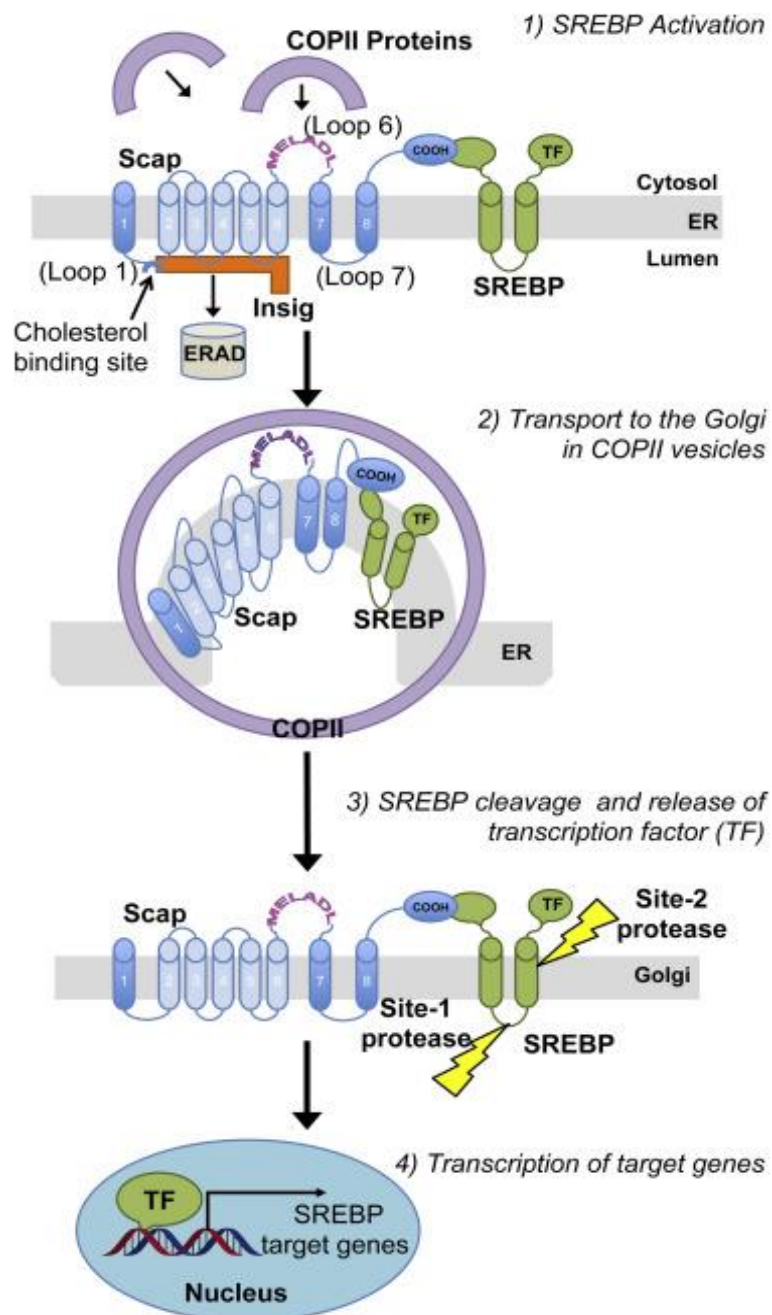


Abbildung 4. Regulationsmechanismen der Cholesterol-Biosynthese II

Bei Cholesterolmangel in der Zelle wird der SREBP/SCAP-Komplex in COPII-Vesikeln verpackt und SREBP durch zwei Proteasen gespalten. Der N-Terminus gelangt in den Zellkern und bindet an SRE (Sterol Regulatory Element)-Sequenzen. Dadurch wird die Expression vieler an der Cholesterolsynthese beteiligter Gene gefördert (Howe et al. 2016).

1.2 Wichtige biochemische Effektor-Mechanismen des Cholesterols und seiner Metaboliten

Cholesterol ist eine wichtige Ausgangssubstanz für eine große Zahl physiologisch wichtiger Stoffe. Dazu gehören Sexualhormone, Cortisol, Vitamin D und die Gallensäuren. Die Versorgung einer Zelle mit Cholesterol erfolgt entweder über die zelleigene Biosynthese oder über die Aufnahme mittels LDL-Rezeptoren aus dem Plasma (Brown und Goldstein 1984; Goldstein und Brown 1990). Fast jede menschliche Zelle kann Cholesterol synthetisieren, sodass Nahrungscholesterol für den Menschen nicht essentiell ist.

Der Mevalonatweg wird durch Cholesterol selbst sowie bestimmte Metabolite, sogenannte Oxysterole, reguliert (siehe Abb. 3) (Adams et al. 2004; Brown et al. 1984; Radhakrishnan et al. 2008). Schon in frühen Studien (Schoenheimer und Breusch 1933; Gould et al. 1954) wurde gezeigt, dass eine Cholesteroldiät (1 %) in Tieren die intrazelluläre Cholesterolsynthese inhibieren kann. Goldstein und Brown gelang es, den molekularen Mechanismus aufzuklären (Brown und Goldstein 2008). Sie konnten auch zeigen, dass nicht nur reines Cholesterol, sondern auch Cholesterol in Form von Low-Density-Lipoprotein (LDL) die HMGCR inhibieren kann.

Oxysterole stellen eine wichtige Klasse potenter Regulatoren der Cholesterolhomöostase dar und haben diverse biologische Funktionen. 25-Hydroxycholesterol ist das meist untersuchte Oxysterol und ist 50-fach potenter in der Inhibition des Mevalonatweges als Cholesterol selbst (Adams et al. 2004). Die Konvertierung von Cholesterol zu 25-Hydroxycholesterol erfolgt auf unterschiedlichen Wegen, durch Oxygenasen der Cytochrom P450-Familie (CYP27A1, CYP3A4) oder Nicht-hämeisen-Enzyme wie die 25-Hydroxylase. Die wichtigste Aufgabe des enzymatisch gebildeten 25-Hydroxycholesterols ist, über das Schlüsselenzym HMG-CoA-Reduktase die Cholesterolbiosynthese zu steuern, so dass stets ein Gleichgewicht zwischen der endogenen Synthese und der exogenen Zufuhr besteht. Auf der anderen Seite ist die Bedeutung des 25-Hydroxycholesterols in der Regulation des Immunsystems nicht zu unterschätzen (Diczfalusy 2012).

Die anderen in dieser Arbeit untersuchten Oxysterole sind 22(R)-Hydroxycholesterol, 24(S)-Hydroxycholesterol und 27-Hydroxycholesterol. 27-Hydroxycholesterol ist ein Intermediat der Gallensäuresynthese und korreliert mit dem Cholesterolspiegel in der Zelle (Dzeletovic et al. 1995; Bjorkhem et al. 2006). 27-Hydroxycholesterol wird in den meisten Zellen durch eine 27-Hydroxylase (CYP27A1) gebildet und kann über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn gelangen. Es gibt Hinweise, dass 27-Hydroxycholesterol in die Pathogenese der Alzheimerschen

Krankheit (Bjorkhem et al. 2006; Martins et al. 2006) involviert ist. Es wurde bereits eine Korrelation zwischen Hypercholesterolämie und der erhöhten Aufnahme von 27-Hydroxycholesterol in das Gehirn gezeigt (Heverin et al. 2004).

Im Vergleich zu 27-Hydroxycholesterol wird 24-Hydroxycholesterol im Gehirn direkt gebildet und kann über die Blut-Hirn-Schranke in die Peripherie gelangen. 24-Hydroxycholesterol wird ebenfalls in Verbindung mit neurogenerativen Erkrankungen gebracht (Heverin et al. 2004).

Alle beschriebenen Oxysterole sind Liganden der nukleären Rezeptoren Leber-X-Rezeptor- α (LXR α) und Leber-X-Rezeptor- β (LXR β). Viele Eigenschaften dieser Sterole lassen sich durch die Bindung an diese Rezeptoren und die daraus folgende Aktivierung von bestimmten Zielgenen erklären. Die größte Affinität aller Sterole zu diesen Rezeptoren hat 22-Hydroxycholesterol, allerdings ist dessen Funktion noch am wenigsten untersucht (Vaya et al. 2007).

Oxysterole werden außer durch enzymatische Hydroxylierung auch bei der Lipidperoxidation gebildet (Smith 1996; Zieden et al. 1999). Verhagen et al. konnten in einem oxidativ modifizierten LDL, welches aufgrund seiner Zytotoxizität wohl eine zentrale Rolle in der Atherogenese aufweist, im Rahmen der Lipidperoxidation gebildete Oxysterole wiederfinden (Verhagen et al. 1996). Es konnten auch hohe Konzentrationen an Oxysterolen in atherogenen Läsionen nachgewiesen werden (Suarna et al. 1995). Überwiegend waren dort jedoch Oxysterole zu finden, die im Vergleich zu den in dieser Arbeit untersuchten Oxysterolen durch direkte Einwirkung reaktiver Sauerstoffspezies entstehen (z.B. 7 β -Hydroxycholesterol (7 β -OH-Chol), 7-Ketocholesterol (7-Keto-Chol), Cholestantriol (3 β , 5 α , 6 β -trihydroxycholestan) und die epimeren Cholesterol-5,6-Epoxide) (Smith 1996). *In vitro*- und *in vivo*-Analysen hemmten sie interessanterweise auch das Enzym HMGCR, ähnlich wie bei den in der Seitenkette hydroxylierten Oxysterolen (Kandutsch 1973).

Der Mevalonatstoffwechsel (Abb. 1) liefert auch Zwischenprodukte, die für die Synthese und Funktion vieler Proteine eine entscheidende Rolle spielen. Die gebildeten Isoprenoide dienen nicht nur als Membrananker für kleine GTPasen, sondern sind auch für die post-transkriptionelle Modifikation der Selenocystein-tRNA essentiell (Sec-tRNA). Die Selenocystein-tRNA ist eine spezielle und singuläre tRNA, welche während der Proteinbiosynthese den Einbau von Selenocystein (Sec), der 21. proteinogenen Aminosäure, vermitteln kann (Kim et al. 2000; Fradejas et al. 2013). Hierdurch entstehen die sogenannten Selenoproteine (Tab. 1). Die Sec-tRNA erfährt mehrere post-transkriptionelle Modifikationen, unter anderem eine

funktionell relevante Methylierung an 5-Methoxycarbonylmethyluridin 34, welche 5-Methoxycarbonylmethyl-2'-O-methyluridin (mcm5U34m) liefert, sowie die Isopentenylisierung an Adenosin 37 (i6A37, N6-Isopentenyladenosin 37) (Kim et al. 2000; Fradejas et al. 2013). Im Jahre 2013 wurde die dafür zuständige humane Isopentenyltransferase TRIT1 charakterisiert (Fradejas et al. 2013). Damit spielt das im Mevalonatweg gebildete IPP eine strukturelle Rolle in der Synthese der Selenoproteine.

Durch transgene Mausmodelle wurden viele Eigenschaften von Selenoproteinen untersucht. Besonders instruktiv war ein Modell mit einer gezielten Inaktivierung der Sec-spezifischen tRNA (Carlson et al. 2004).

Die meisten Selenoproteine sind an der antioxidativen Abwehr beteiligt. Die Gruppe der Selenoproteine wird durch 25 Gene kodiert. Die am meisten untersuchte Gruppe ist die der Glutathionperoxidasen (GPx). Sie katalysieren den Gluthation-abhängigen Abbau von Peroxiden zu Alkoholen (Flohe et al. 1999). Damit verringern sie die Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies und deren schädigende Wirkung auf Membranen, Proteine und DNA. Eine zweite wichtige und gut charakterisierte Klasse der Selenoproteine ist die der Thioredoxin-Reduktasen. Thioredoxin-Reduktasen und Glutathionperoxidasen kontrollieren den Redox-Status einer Zelle (Lu und Holmgren 2013). Neben diesen wichtigen Gruppen gibt es auch einzelne Selenoproteine, die zu keiner Familie gehören (Tab. 1). Noch nicht von allen ist die Funktion charakterisiert.

Die Synthese der Selenoproteine findet organspezifisch statt, gleichzeitig unterliegt sie aber auch zellulär einer Hierarchie (Brigelius-Flohe 1999). Dieses konnten Behne et al. im Jahr 1988 erstmals demonstrieren. Hier zeigte sich unter einem Selenmangel eine rasche Reduktion der Selenoproteine in der Leber, den Skelettmuskeln und im Blut. Im Gegensatz dazu war im Gehirn nur eine geringe Abnahme an Selenoproteinen zu beobachten. Eine Selendefizienz wirkt sich nicht nur auf die Proteinlevel, sondern auch auf die Menge der Selenoprotein-mRNA aus. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Level der Glutathionperoxidase (GPx) und des Selenoproteins P (SelP) bei Selenmangel sinken, vermutlich aufgrund einer geringeren Stabilität der mRNA (Moriarty et al. 1998).

Tabelle 1. Selenoproteine und Funktionsbeschreibung

Name	Abkürzung	Funktion
Glutathionperoxidase 1	GPx1	Antioxidans (Cytosol)
Glutathionperoxidase 2 (gastrointestinale)	GPx2	Antioxidans, gastrointestinaler Trakt
Glutathionperoxidase 3 (Plasma)	GPx3	Antioxidans (Plasma)
Glutathionperoxidase 4	GPx4	Antioxidans (Membran)
Glutathionperoxidase 6	GPx6	Antioxidans (olpaktorisches Epithel)
Methionin-R-Sulfoxid Reduktase 1	MsrB1	Reduktion von Methionin-Resten in Cytosol
Thioredoxin-Reduktase 1	TrxR1	Antioxidans (Cytosol)
Thioredoxin-Reduktase 2	TrxR2	Antioxidans, Mitochondrien
Thioredoxin-Reduktase 3	TrxR3	Antioxidans, Hoden
Selenoprotein P	SelP	Antioxidans, Transport von Selen
Iodothyronin Deiodinasen Typ I	DIO1	Umwandlung von Thyroxin in Triiodthyronin
Deiodinasen Typ II	DIO2	Umwandlung von Thyroxin in Triiodthyronin
Deiodinasen Typ III	DIO3	Umwandlung von Thyroxin in Triiodthyronin
Selenophosphat-Synthetase	SPS2	Synthese von Selenophosphat Chemoprotektive Effekte
15kDa Selenoprotein	Sep15	Unbekannt
Selenoprotein H	SelH	Unbekannt
Selenoprotein I	SelI	Antioxidans (Herz)
Selenoprotein K	SelK	Chemoprotektive Effekte
Selenoprotein M	SelM	Unbekannt
Selenoprotein O	SelO	Unbekannt
Selenoprotein N	SelN	Muskelentwicklung
Selenoprotein S	SelS	Rücktransport fehlgefalteter ER-Proteine
Selenoprotein W	SelW	Antioxidans

(nach Huang et al. 2010)

Für das Spurelement Selen sind sowohl Vergiftungen als auch durch einen Mangel bedingte Pathologien bekannt. Typische Frühsymptome für eine Vergiftung sind Übelkeit, Durchfall, Muskelschwäche; als Spätsymptome sind Hautläsionen und Haarverlust bekannt (Rayman 2012). Es gibt aber auch zwei relativ klar umrissene Krankheitsbilder, die mit einem Selenmangel assoziiert sind. Die Keshan-Krankheit besteht im Wesentlichen in einer in bestimmten

Selenmangelgebieten endemischen Kardiomyopathie. Als Cofactor für den Ausbruch dieser Krankheit wird neben dem Selenmangel noch eine Infektion mit Coxsackie-Viren angenommen (Beck et al. 2003). Die Kashin-Beck-Krankheit ist eine dystrophische Osteoarthrose und ist in erster Linie in schlecht ernährten Bevölkerungsgruppen in Tibet, Sibirien und China verbreitet (Alfthan et al. 2000).

1.3 Cholesterol und sein Einfluss bei kardiovaskulären Erkrankungen

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wussten Ärzte und Wissenschaftler wenig über kardiovaskuläre Erkrankungen. Im Jahre 1920 entdeckte Anitschkow einen Zusammenhang zwischen Cholesterol und einer Form der Arteriosklerose in Kaninchen (Anitschkow et al. 1933). Später beschrieb er die Beteiligung von Lymphozyten, Leukozyten, Blutplättchen und glatter Muskulatur an der Entstehung von Plaques. Seine Studien basierten auf cholesterolgefütterten Kaninchen. Bei Verabreichung von Cholesterol an Kaninchen in hohen Konzentrationen wurde eine enorme Cholestrolinfiltration der inneren Organe beobachtet, zusammen mit einer hochgradigen Hypercholesterolämie. Später folgten arterioskleroseähnliche Veränderungen der Gefäße.

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist eine komplexe Erkrankung, die aus zwei Phasen besteht: einer chronischen und einer akuten Phase. Unter Arteriosklerose wird dabei eine Vielzahl von Umbauvorgängen im arteriellen Gefäßbereich zusammengefasst, z.B. ein Elastizitätsverlust der Gefäße, eine Einengung des Gefäßvolumens und die Veränderung des Gefäßendothels. Zu einer fortgeschrittenen Arteriosklerose gehören eine Ablagerung von Lipiden und kollagenreichem Bindegewebe (Plaques) in der Intima, eine Proliferation der glatten Muskelzellen sowie eine spätere Ablagerung von Calciumsalzen (Galkina et al. 2008).

Das Auftreten einer fortgeschrittenen Arteriosklerose in den Koronararterien allein garantiert noch nicht, dass man ein koronares Ereignis erleiden wird. Die beliebteste Theorie zur Erklärung der koronaren Ereignisse ist die Verletzungstheorie. Damit es zu einem Herzinfarkt kommt, muss es nach diesem Modell eine Art Auslöser geben, der die akute Phase der KHK einleitet (Colpo 2009). Solche Reize können Infektionen, Stress und ein erhöhter Blutdruck sein. Infolge kommt es zur Aggregation von Blutplättchen, die Wachstumsfaktoren freisetzen z.B. PDGF. Dadurch wird die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen in der Intima gefördert. Es wird neues Bindegewebe synthetisiert und Lipide werden akkumuliert. Liegt zusätzlich eine Hyperlipidämie vor, wird die Arteriosklerosebildung oftmals über das Cholesterol bzw. über cholesterolbeladene LDL-Lipoproteine erklärt.

Die oben angegebenen Risikofaktoren führen insgesamt zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels für Lipoproteine. Durch bestimmte Trigger werden Phospholipide der LDL-Partikel in der Intima oxidiert und über Scavenger-Rezeptoren von Makrophagen endozytotisch aufgenommen. Dadurch entstehen mit Cholesterol beladene Schaumzellen. Die Schaumzellen sezernieren dann unterschiedliche Zytokine, die im Gefäß zu Entzündungen führen.

Die eingewanderten Monozyten und Makrophagen setzen dann selbst Wachstumsfaktoren frei, die weitere Zellen anlocken und zur Vermehrung führen.

Es wird angenommen, dass oxidiertes LDL eine Co-Ursache für Arteriosklerose ist. Daher könnte die Reduktion der LDL-Oxidation ein potenzieller Ansatz sein, um das Risiko einer Arteriosklerose zu reduzieren (Oliveira et al. 2015). LDL-Partikel können in ihre supramolekulare Struktur endogene und exogene Antioxidantien aufnehmen. Es hat sich gezeigt, dass viele natürliche und synthetische Antioxidantien LDL auch *in vivo* vor Oxidation schützen können (Chu und Liu 2005; Barcelos et al. 2011).

Eine von vielen Ursachen der Arteriosklerose ist also die Hypercholesterolämie. Die Hypercholesterolämie ist ein Zusammenspiel von Umwelt- und genetischen Faktoren.

Die familiäre Hypercholesterolämie (FH) ist eine autosomal vererbte Krankheit, bei der es zur übermäßigen Steigerung des Cholesterolspiegels und Entstehung einer frühzeitigen Arteriosklerose kommt. Sie ist mit einer Heterozygotenfrequenz von ca. 1:500 eine der häufigsten monogenetisch vererbten Stoffwechselerkrankungen (Levenson et al. 2016). Homozygote Patienten entwickeln schon im frühen Kindesalter eine rasch voranschreitende Arteriosklerose der Koronararterien und Aortenklappen, die zur Angina Pectoris, frühzeitigem Herzinfarkt und plötzlichem Herztod schon vor dem 10. Lebensjahr führen kann. Goldstein und Brown (1984) trugen wesentlich zur biochemischen und molekulargenetischen Charakterisierung dieser Krankheit bei. Ursachen der FH sind Mutationen im LDL-R-Gen bzw. Mutation im Gen für das Apolipoprotein B oder das Protein Subtilisin/Kexin type 9 (PCSK9). Als Folge der Veränderungen in der Funktion des Rezeptors oder der anderen Proteine (Levenson et al. 2016) sinkt die LDL-Aufnahme in die Zelle, dagegen steigen die Serum-LDL-Konzentration und die intrazelluläre Cholesterolsynthese. Die erhöhte Konzentration des Gesamt- und LDL-Cholesterins im Plasma führen zu sichtbaren Ablagerungen des Cholesterins in Form von Xanthelasmen und als Arcus lipoides corneae im Bereich der Augen somit in Form von Xanthomen in der Haut und den Sehnen, vor allem der Achillessehne. Neben diesen eher ästhetischen Störungen kommt es aber auch zu Einlagerungen des Cholesterins in die Gefäßwände, insbesondere in den Koronararterien, was zur Ausbildung einer frühzeitigen Atherosklerose führt.

1.4 Assoziation des Cholesterols mit anderen Krankheiten

Die Aufmerksamkeit vieler Pathologen wendet sich heutzutage mehr und mehr der Bedeutung und Funktion von Cholesterol im Gehirn zu. Defekte im Cholesterol-Metabolismus werden in Zusammenhang mit neurogenerativen Erkrankungen wie z.B. der Alzheimerschen Krankheit und Parkinson gebracht (Zhang und Liu 2014). Allerdings ist die häufig verdächtige Hypercholesterolämie als Ursache kritisch zu hinterfragen, da peripherer und zentraler Cholesterolmetabolismus getrennt gesehen werden müssen (Segatto et al. 2012).

Das Cholesterol im Gehirn repräsentiert 25 % des Gesamtcholesterolgehaltes in einem menschlichen Organismus. Dieses Cholesterol ist auf zwei Pools verteilt, zum einen auf die Zellmembran von Glia-Zellen und Neuronen, zum anderen auf den Membran-Pool des Myelins. Die Cholesterolhomöostase im Gehirn wird durch die Cholesterol-Aufnahme über ApoE-haltige Lipoproteine und die intrazelluläre Synthese balanciert. Das Gehirn verfügt über eigene, spezielle Regulations- und Eliminationswege, über welche der Cholesterolmetabolismus kontrolliert wird. Zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*-Studien (Gamouch et al. 2016) der letzten Jahre haben angedeutet, dass Cholesterol eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Entwicklung der Alzheimerschen Krankheit spielen könnte. Es ist aber noch nicht geklärt, ob zu hohe oder etwa zu niedrige Cholesterinwerte das Risiko, an einer Alzheimerschen Krankheit zu erkranken, erhöhen (Gamouch et al. 2016). So wurde zu einem gezeigt, dass erhöhte Cholesterolesterspiegel im Plasma mit der Krankheit korrelieren. Es wurde postuliert, dass eine Hypercholesterolämie als ein möglicher Marker für oxidativen Stress stehen könnte. Oxidativer Stress spielt eine signifikante Rolle in der Pathogenese von der Alzheimerschen Krankheit (Smith et al. 1998; Aytan et al. 2008). Die Frage der Deregulation der antioxidativen Abwehr bei einer Hypercholesterolämie und der Alzheimerschen Krankheit bleibt aber noch unbeantwortet. Andere Studien beschreiben allerdings, dass eine niedrige Konzentration an Cholesterol- und Cholesterolestern im Gewebe eine erhöhte Produktion von Beta-Amyloid-Plaques (Amyloid β (A β)) im Gehirn induzieren (Gamouch et al. 2016).

Eine Stellung in der Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit nehmen wohl auch Oxysterole ein. Diese Substanzen werden peripher und zentral gebildet und können im Vergleich zum Cholesterol die Blut-Hirn-Schranke passiv passieren und damit eventuell eine Verbindung zwischen erhöhtem peripherem Cholesterol und der Alzheimerschen Krankheit schaffen. Bestimmte Oxysterole werden peripher (z.B. 27-Hydroxycholesterol) oder zentral (z.B. 24-Hydroxycholesterol) produziert und in Zusammenhang mit der Alzheimerschen Erkrankung gebracht (Bjorkhem et al. 2006; Martins et al. 2006).

Seit Langem wird eine Rolle des Cholesterols bei Infektionskrankheiten diskutiert. (Frauenberger et al. 1999; Chiarla et al. 2004). Injiziert man Ratten mit einer Hypercholesterolämie Endotoxine (Lipopolysaccharide, LPS), gibt es unter ihnen eine deutlich geringere und verzögerte Sterblichkeit als bei Ratten mit einer Hypocholesterolämie (Feingold 1995).

Das Phänomen einer Hypocholesterolämie in Assoziation mit schwerer Infektion und Sepsis ist in vielen klinischen Studien beschrieben (Iribarren et al. 1998; Wilson et al. 2003; Dunham und Chirichella 2011). In diesen retrospektiven Studien wurde die Hypocholesterolämie als negativer Prädiktor für die weitere Krankheitsprogression identifiziert. Eine prospektive Studie von Dunham et al. bestätigte ebenfalls die negativen Auswirkungen eines niedrigen Cholesterolspiegels auf die Prognose (Dunham et al. 2003).

Es wird angenommen, dass sowohl Cholesterol selbst wie auch Oxysterole immunmodulatorische Eigenschaften haben und in die Regulation von adaptivem und angeborenem Immunsystem involviert sind (Spann und Glass 2013). Am Beispiel von 25-Hydroxycholesterols (25-HC) wurden antivirale Eigenschaften von Oxysterolen beschrieben. Bei einer viralen Infektion wird die 25-Hydroxylase-Expression induziert, wodurch mehr 25-HC produziert wird. Über die Wirkung auf LXR-Rezeptoren hemmt 25-HC dann über den SREBP2-Weg die Replikation von bestimmten Viren, einschließlich HIV- und Hepatitis C-Viren (Spann und Glass 2013). Ferner gibt es Studien, wonach cholesterolsenkende Medikamente sich auf das Immunsystem und damit auf die Kontrolle von Entzündungen auswirken (Fessler 2015). Einige Studien beschreiben z.B. eine protektive Rolle von Statinen vor Mortalität bei schweren Infektionen und Sepsis (Almog et al. 2004; Mortensen et al. 2005; Janda et al. 2010, Rothberg et al. 2012). Andere Studien beschreiben jedoch das Gegenteil (Yende et al. 2011; Goodin et al. 2011). In diesen Studien wurde kein Nutzen der Verwendung von Statinen bei Sepsis festgestellt.

1.5 Strategien zur Beeinflussung des Cholesterolspiegels und zur generellen Prävention von Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems

1.5.1 Lebensstil und Ernährung

Viele epidemiologische Studien haben eine Assoziation von Ernährungsgewohnheiten, körperlicher Aktivität, erhöhtem Serumcholesterol, Zigarettenkonsum und arterieller Hypertonie mit der Entstehung arteriosklerotischer Gefäßveränderungen gezeigt. Es fiel aber in diesen Studien auf, dass man nur etwa 50 % der Gesamtfälle der Arteriosklerose damit vorhersagen

konnte (Haynes et al. 1980). Es war notwendig, nach weiteren Faktoren zu suchen. Es war naheliegend, psychosoziale Belastungen als einen zusätzlichen Risikofaktor einzustufen (Haynes et al. 1980; Muldoon et al. 1995). Unabhängig davon, ob erhöhte Cholesterolvere primärer oder sekundärer Ursache sind, bildet eine Lebensstiländerung die Basis der Therapie. Dazu gehört neben Bewegung eine entsprechende Diät. Leitlinien wie der „Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP)“ setzen seit über 10 Jahren bestimmte Standards in der Cholesteroltherapie. Zum Teil gegensätzlich stehen zu diesen Leitlinien Studien, die einen Zusammenhang zwischen einem hohen Cholesterolverwert und allgemeiner Langlebigkeit bestätigten (Strandberg et al. 2004). Ob eine cholesterolare Ernährung vor hohen LDL-Cholesterolverwerten schützt, ist aber heute umstritten. Aktuelle Studien zeigen keinen Zusammenhang zwischen dem Konsum cholesteroreicher Lebensmittel und einem Anstieg des Cholesterolverspiegels (Donald 2015). Die Ergebnisse der aktuellsten Studie von Kim and Campbell 2018 demonstrieren eine geringe Resorption des Cholesterols aus Eiern. Dies erklärt, warum das Cholesterolver in Eiern die Gesamtcholesterolverkonzentration im Plasma nicht akut beeinflusst und nicht mit einer längerfristigen Plasmacholesterolverkontrolle verbunden ist (Kim und Campbell 2018).

1.5.2 Arzneimitteltherapie

I. Statine

Die Standardtherapie zur LDL-Cholesterolverenkung ist die Gabe eines Statins. Statine sind kompetitive Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym für die Cholesterolver- und Isoprenoidsynthese im Mevalonatweg.

Obwohl eine Vielzahl von Nonstatin-Medikamenten in klinischen Studien getestet worden war, fanden sie im klinischen Umfeld aufgrund mangelnder Mortalitätsreduktion oder Verträglichkeitsprobleme nur eingeschränkten Nutzen. Als mehrere prospektiv randomisierte Statinstudien ihre Ergebnisse veröffentlichten, wurde deutlich, dass die Verringerung der Belastung durch atherogene Lipoproteine mit diesen Medikamenten hochwirksam, sicher und im Allgemeinen gut verträglich war. Es wurde gezeigt, dass Statine das Risiko für nicht tödliche Herzinfarkte, einen ischämischen Schlaganfall, die Notwendigkeit einer Revaskularisierung sowie für die kardiovaskulären Todesursachen verringern (Sacks et al. 1996; Shepherd et al. 1995; Shepherd et al. 2002). Es wurde auch gezeigt, dass sie etablierte atherosklerotische Plaques stabilisieren und sogar zurückbilden (Cannon et al. 2004; LaRosa 2004).

Die positiven Effekte bei kardiovaskulären Ereignissen sind möglicherweise nicht allein durch die cholesterolsenkenden Effekte der Statine zu erklären (LaRosa et al. 1999). Statine besitzen sogenannte pleiotrope Effekte, die unabhängig vom Haupteffekt, der Senkung des LDL-Spiegels, auftreten. Pleiotrope Statineffekte kommen unter anderem durch die Verminderung der intrazellulären Konzentration von Zwischenprodukten des Cholesterolsynthesewegs (Mevalonat, Geranyl-Pyrophosphat, Farnesyl-Pyrophosphat) zustande. Dadurch können Synthese und Funktion bestimmter Signalmoleküle wie der Rho-, Ras- und Rac-Proteine (Schierwagen et al. 2017) oder der Selenoproteine (z.B. Gluthationperoxidasen) (Kromer et al. 2009; Fuhrmeister et al. 2012) gestört werden. Darüber hinaus haben Statine antiinflammatorische (Senkung des C-reaktiven Proteins) und immunsuppressive (Abnahme der T-Lymphozytenaktivität) Eigenschaften (Jain et al. 2005).

Aufgrund ihrer chemischen Struktur werden Statine in zwei Gruppen eingeteilt: natürlich vorkommende oder semisynthetische wie Lovastatin, Pravastatin und Simvastatin, oder synthetische wie Fluvastatin, Atorvastatin, Pitavastatin und Rosuvastatin.

Das eingenommene Statin führt zur intrazellulären Cholesterolsenkung. Als Folge des intrazellulären Cholesterolmangels wird der SREBP-Weg aktiviert und Expression von bestimmten Genen wie deren des LDL-Rezeptors gesteigert (Abb. 5). Durch eine erhöhte Aufnahme von LDL-Partikeln aus dem Blut sinkt anschließend der Cholesterolspiegel im Blut.

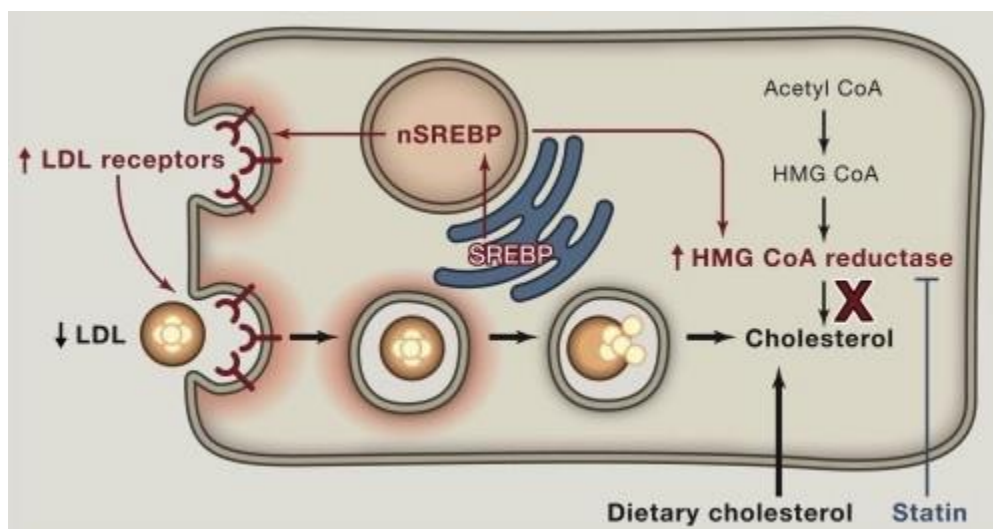


Abbildung 5. Wirkungsmechanismus von Statinen

Statine sind kompetitive Hemmer der HMG-CoA-Reduktase. Sie unterdrücken die Cholesterolsynthese und senken die Cholesterolkonzentration in der Zelle. Über SREBP vermittelt werden mehr LDL-Rezeptoren exprimiert und LDL aus der Peripherie aufgenommen, wodurch das LDL-Cholesterol im Blut sinkt (Goldstein und Brown 2015).

Statine haben im klinischen Alltag einen hohen Stellenwert und werden in der Regel gut vertragen, allerdings weisen sie bestimmte Nebenwirkungen auf. In erster Linie sind es Muskelbeschwerden, wie Myalgie oder Myositis, assoziiert mit Steigerung der Creatin-Kinase (CK). Eine schwere Komplikation dabei ist die Rhabdomyolyse (Daneschvar et al. 2015), die oft durch eine Interaktion mit anderen Medikamenten wie Fibraten begünstigt wird. Der Mechanismus der statininduzierten Muskelschwächen besteht vermutlich in der Unterdrückung der Selenoproteine, die in die antioxidative Abwehr, aber auch in die Muskelhomöostase involviert sind (Kromer et al. 2009; Fuhrmeister et al. 2012).

II. Anionenaustauscher

Mit Anionenaustauschern erreicht man eine klinische LDL-Cholesterol-Senkung von maximal 30 % (Feingold et al. 2016). Die Wirkung beruht dabei auf der Bindung der Gallensäuren im Darm, wodurch die Rückresorption von Gallensäuren gehemmt und ihre Ausscheidung erhöht wird. Daraufhin wird in der Leber die Umsetzung von Cholesterol in Gallensäuren gesteigert, was indirekt zu einer Senkung des Cholesterolspiegels führt. Ihre Bedeutung liegt hauptsächlich in der Kombinationstherapie mit Statinen und in der dann erreichbaren LDL-Senkung von bis zu 60 %. Besonders erfolgreich kann diese Kombination bei Patienten mit einer heterozygot-familiären Hypercholesterolämie eingesetzt werden. Für klinisch relevante Endpunkte in der KHK gibt es kein Nutznachweis von Anionenaustauschern.

III. Resorptionshemmer

Ezetimib ist ein selektiver Cholesterol-Resorptionshemmer, der die Resorption des mit der Nahrung zugeführten und biliären Cholesterols unterbindet. Das molekulare Ziel von Ezetimib ist der Steroltransporter Niemann-Pick C1-like Protein 1 (NPC1L1), der für die intestinale Aufnahme von Cholesterol und Phytosterolen verantwortlich ist (Feingold et al. 2016). Ezetimib kann mit Statinen und Fibraten kombiniert werden.

In der Studie von Kastelein et al. 2008, in der die Auswirkungen der täglichen Therapie mit 80 mg Simvastatin entweder mit Placebo oder mit 10 mg Ezetimib bei 720 Patienten mit familiärer Hypercholesterolämie verglichen wurden, profitierten die Patienten nicht von der Zusatztherapie mit Ezetimib (Kastelein et al. 2008).

Trotz der effektiven Senkung des Cholesterols mit Ezetimib konnte die Gesamtmortalität, die kardiovaskuläre Mortalität und die Todesrate durch kardiovaskuläre Erkrankungen jedoch nicht verringert werden (Kastelein et al. 2008; Špinar J et al. 2014). Deswegen wird diese

Klasse der Medikamente zur alleinigen Cholesterolsenkung in den Leitlinien kaum noch berücksichtigt.

IV. Fibrate

Fibrate sind Agonisten der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren α (PPAR α) und beeinflussen die Transkription vieler Gene und damit Stoffwechselwege der Lipoproteine und Fettsäuren. Dadurch sind vielfältige Effekte der Fibrate erklärbar (Shipman et al. 2016). Zusammenfassend erhöhen Fibrate leicht den HDL-Cholesterolspiegel, erniedrigen die Triglyceridwerte und im geringeren Maße die LDL-Cholesterolverte. Fibrate werden präventiv bei einer Triglyceridämie und damit verbundener Pankreatitis eingesetzt. In Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen gibt es widersprüchliche Ergebnisse zur Prognoseverbesserung (Rubins et al. 1999; Shipman et al. 2016).

Muskelbeschwerden als Nebenwirkungen von Fibraten sind am Beispiel von Gemfibrozil am besten beschrieben und werden in einer Kombinationstherapie mit Statinen verstärkt. Der Mechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt, aber beide Arzneistoffe greifen an der HMG-CoA-Reduktase an, Fibrate eher indirekt, Statine sind direkte Hemmer dieses Schlüsselenzyms der Cholesterolsynthese. Die Depletion von Mevalonat könnte zur Reduktion von Intermediärprodukten, die für die Funktion von bestimmten Proteinen notwendig sind, führen (Kromer et al. 2009; Terry und Jacobson 2009).

V. PCSK9-Inhibitoren

Im Jahre 2015 wurden zwei monoklonale Antikörper, die die Proproteinkonvertase Subtilisin/Kexin-Typ-9 (PCSK9) inhibieren, zur Cholesterolsenkung zugelassen. PCSK9 wird in der Leber exprimiert und in die Peripherie ausgeschleust, wo es an einen LDL-Rezeptor bindet und dessen Metabolismus verändert. Nach Entladung des Cholesterols in der Zelle kehrt der LDL-Rezeptor wieder an die Oberfläche zurück. PCSK9 kann diesen Prozess hemmen, sodass der LDL-Rezeptor proteolytisch abgebaut wird. Demzufolge kann extrazelluläres Cholesterol nicht mehr aufgenommen werden. Der Unterschied zu anderen cholesterolsenkenden Pharmaka besteht darin, dass diese spezifischen monoklonalen Antikörper die Degradation von LDL-Rezeptoren hemmen und nicht wie Statine ihre Expression steigern (Feingold et al. 2016). PCSK9 ist auch ein Targetgen von SREBP-2. Statine aktivieren durch cholesterolsenkende Effekte SREBP-2 und schwächen damit ihre eigene Wirkung partiell ab. Deswegen wirkt die Therapie in einer Kombination mit PCSK9-Inhibitoren besonders intensiv (Feingold et al. 2016).

Bislang haben selektive monoklonale Antikörper gegen PCSK9 (Alirocumab, Evolocumab, Bococicumab) nur ein minimales Spektrum an Nebenwirkungen gezeigt. Die Zahl der behandelten Patienten und die Dauer der Behandlungen sind jedoch noch nicht ausreichend, um mögliche seltene schwere Nebenwirkungen zu erkennen.

1.6 Fragestellung

In den letzten Jahren wurde intensive Forschung nach den neuen cholesterolsenkenden Medikamenten betrieben. Jedoch konnten bislang nur Statine positive Effekte auf kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität in langfristigen Studien aufweisen.

Die Wirkstoffgruppe der Cholesterolester-Transfer-Protein-(CETP)-Hemmer hat 2006 die Bühne verlassen: Die Studie über den CETP-Hemmer Torcetrapib wurde aufgrund erhöhter Sterblichkeit unter den Probanden abgebrochen (Nissen et al. 2007). Die klinische Entwicklung eines weiteren CETP-Hemmers Dalcetrapib wurde aufgrund einer mangelnden klinischen Wirksamkeit in 2012 auch gestoppt (Schwartz et al. 2012).

Die Hoffnung, mit einem Acetyl-CoA-Cholesterol-Acetyltransferase (ACAT)-Inhibitor den Krankheitsprozess der Arteriosklerose zu stoppen, ist in 2006 ebenfalls zerschlagen (Nissen et al. 2006).

Offensichtlich ist der Cholesterol-Lipoprotein-Stoffwechsel in wesentlichen Teilen noch unverstanden.

Die Tatsache, dass nur Statine, die direkt den Mevalonatweg hemmen und dadurch trotz bestimmter Nebenwirkungen präventive Eigenschaften im Bezug auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen haben, lässt vermuten, dass diese positive Wirkung nicht allein durch die Senkung des Gesamtcholesterols zu begründen ist. Möglicherweise könnten positive Effekte einer geringen Statindosis mit einer Enthemmung der endogenen Inhibition der zellulären Cholesterolsynthese, ohne Cholesterolspiegel stark zu senken, zu erklären sein.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der endogenen Inhibition der Cholesterolsynthese durch Cholesterol selbst sowie seine Auswirkungen auf die Biosynthese der Selenoproteine. Spielt Cholesterol bei der Regulation der Selenoproteine eine ähnliche oder gegenläufige Rolle wie die Statine? Darüber hinaus soll die Rolle der Selenoproteine bei einer Hypercholesterolämie überdacht werden.

2 Materialien

2.1 Puffer und Lösungen

2.1.1 Allgemein verwendete Puffer und Lösungen

10x Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

1,37 M NaCl

27 mM KCl

100 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

18 mM KH₂PO₄

pH 7,4 (mit NaOH)

1x Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween-20 (PBS-T)

1x PBS

0,05 % (v/v) Tween 20

10x Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)

0,25 M Tris-Base

1,37 M NaCl

27 mM KCl

pH 7,4 (mit NaOH)

1x Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20 (TBS-T)

1x TBS

0,05 % (v/v) Tween 20

pH 7,4 (mit NaOH)

2.1.2 Proteinanalytik

10x Laufpuffer für SDS-PAGE

250 mM Tris-Base

2.5 M Glycin

1 % (w/v) SDS

pH 8,3 (Tris/Tris-HCl)

10x Transferpuffer für SDS-PAGE

250 mM Tris-Base

2.5 M Glycin

Addition von 20 % (v/v) Methanol bei Herstellung der 1x-Verdünnung

4x Ladepuffer für die SDS-PAGE

20 mM Tris-HCl

8 % (w/v) SDS

40 % (v/v) Glycerol

0,02 % (w/v) Bromphenolblau

20 % (v/v) β -Mercaptoethanol

ECL-Lösung

Lösung A: 0,1 M Tris-HCl

0,05 % (w/v) Luminol

Lösung B: 0,11 % para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO

Lösung C: 30 % H_2O_2

Ponceau S-Lösung

0,2 % (w/v) Ponceau S

5 % (v/v) Essigsäure in H_2O

Lysispuffer (denaturierend)

100 mM Tris-HCl

0,5 % SDS

10 % (w/v) Sucrose

pH 7,4 (Tris/Tris-HCl)

+ Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma Aldrich, P 2714 (1:100))

Blockierungslösung

2 % (w/v) Magermilchpulver in 1x TBS-T (siehe Kapitel 3.6.5)

2.1.3 Agarose-Gel-Elektrophorese**50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)**

2 M Tris

1 M Na-Acetat x 3H₂O

50 mM EDTA

2 % (w/v) Agarose-Lösung in TAE-Puffer

10x Orange-G-Ladepuffer (in H₂O)

50 % Glycerin

0,5 % Orange G

2.2 Oligonucleotide

Tabelle 2. Verwendete Primer

Primername	Sequenz 5'-3'	Produkt-Größe (bp)
hGPx1 forward	GCA CCC TCT CTT CGC CTT C	
hGPx1 reverse	TCA GGC TCG ATG TCA ATG GTC	207
hGPx4 forward	CGG GCT ACA ACG TCA AAT TCG	
hGPx4 reverse	GGG GCA GGT CCT TCT CTA TCA	222
hTrxR1 forward	TCG CTT TGG AGT GCG CTG GA	
hTrxR1 reverse	GAT TGC AAC TGG GGT GAG CT	439
hSelP forward	GGC CGT CTT GTG TAT CAC CT	
hSelP reverse	TGG TGT TTG TGG TGG CTA TG	209
hGAPDH forward	CAT GAG AAG TAT GAC AAC AGC CT	
hGAPDH reverse	AGT CCT TCC ACG ATA CCA AAG T	113
hHMGCR forward	GGA CCC CTT TGC TTA GAT GAA	
hHMGCR reverse	CCA CCA AGA CCT ATT GCT CTG	107
hTubulin forward	CTG TTC GCT CAG GTC CTT TTG	
hTubulin reverse	CCT CCT TCC GTA CCA CAT CCA	147
mGPx1 forward	CAG TCC ACC GTG TAT GCC TT	
mGPx1 reverse	GAT CGT GGT GCC TCA GAG AG	123
mGPx4 forward	GTT TCG TGT GCA TCG TCA CC	
mGPx4 reverse	GGC ATG CAG ATC GAC TAG CT	83
mSelP forward	TGT CTA AGG AGT CCG AGG CA	
mSelP reverse	GTG ACT TTC TCC TCC GCG AA	154
mHMGCR forward	TGT GGC CAG CAC TAA CAG AG	
mHMGCR reverse	CCT CGA GTC ATC CCA TCT GC	87
mTubulin forward	AGG ATG CTG CCA ACA CCT AC	
mTubulin reverse	TGT AAA TCC CGA CCC T GTG C	161

2.3 Mausmodelle

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei etablierte Arteriosklerose-Maus-Modelle ApoE^{-/-}/LDL-Rezeptor^{-/-}-Knockout untersucht. Dem LDL-Rezeptor^{-/-}-Knockout Modell fehlt primär ein Rezeptor für die Aufnahme von LDL-Cholesterol. Dies führt zu einem Anstieg Plasma-LDL-Spiegel. ApoE-Knockout-Mäuse zeichnen sich durch das Fehlen des für die Aufnahme

von Lipoproteinen notwendigen Ligandens aus. Die ApoE-Knockout-Mäuse haben erhöhte Gesamt-Plasmacholesterinspiegel, die deutlich über die Werte von Kontrolltieren liegen (Vesli et al. 2017).

Als Kontrolltiere fungierten C57BL6/J-Mäuse (Wildtyp, WT). Alle Tiere waren männlich und 20 Wochen alt.

Ein weiteres untersuchtes Modell waren die Diet induced obesity (DIO)-Mäuse. Die männliche C57BL6/J-Mäuse wurden auf eine fettreiche Diät, bei der 60 % der Kalorien aus Fett (DIO 60 %) stammen, gesetzt (Surwit et al. 1988). Die Kontrolltiere erhielten eine entsprechende Kontrolldiät (DIO 10 %).

spezielle Diät (DIO 60 %) Kontrolldiät (DIO 10 %)

Product #	D12492		Product #	D12450B	
	gm%	kcal%		gm%	kcal%
Protein	26	20.0	Protein	19.2	20.0
Carbohydrate	26	20.0	Carbohydrate	67.3	70.0
Fat	35	60.0	Fat	4.3	10.0
Total		100.0	Total		100.0
kcal/gm	5.24		kcal/gm	3.85	
Ingredient	gm	kcal	Ingredient	gm	kcal
Casein, 30 Mesh	200	800	Casein, 30 Mesh	200	800
L-Cystine	3	12	L-Cystine	3	12
Corn Starch	0	0	Corn Starch	315	1260
Maltodextrin 10	125	500	Maltodextrin 10	35	140
Sucrose	68.8	275	Sucrose	350	1400
Cellulose, BW200	50	0	Cellulose, BW200	50	0
Soybean Oil	25	225	Soybean Oil	25	225
Lard	245	2205	Lard	20	180
Mineral Mix S10026	10	0	Mineral Mix S10026	10	0
DiCalcium Phosphate	13	0	DiCalcium Phosphate	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0	Calcium Carbonate	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H2O	16.5	0	Potassium Citrate, 1 H2O	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40	Vitamin Mix V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0	Choline Bitartrate	2	0
FD&C Red Dye #40	0	0	FD&C Yellow Dye #5	0.05	0
FD&C Blue Dye #1	0.05	0	FD&C Red Dye #40	0	0
			FD&C Blue Dye #1	0	0
Total	773.85	4057	Total	1055.05	4057

(researchdiets.com)

D12492

Cholesterol (mg)/4057kcal=216.4

Cholesterol (mg)/kg=279,6

D12450B-H/J/K

Cholesterol (mg)/4057kcal=54.4

Cholesterol (mg)/kg=51.6

(researchdiets.com)

Alle in dieser Arbeit analysierten Mäuse wurden von Jackson Laboratory, Maine, USA bezogen.

2.4 Klonale Zelllinien

Es wurden zwei klonale Zelllinien HepG2 (human hepatocellular carcinoma) und Jurkat (T-Zell-Leukämie) verwendet, die als Repräsentanten für Zellen mit hohem und niedrigem Fluss durch den Mevalonatweg gewählt wurden (Wang et al. 1988; Gutiérrez-García et al. 2013).

HepG2 (Knowles et al. 1980) sind adhärente klonale Leberzellen. Jurkat ist eine Leukämie-Zelllinie, die von menschlichen T-Zellen abstammt (Schneider et al. 1977). Sie ist eine in Suspension wachsende und als solche kultivierende Zelllinie.

Alle Zellen wurden in einem Inkubator (Inkubator HERAcell 240i von Thermo Scientific) unter 5 % CO₂-Begasung bei 37 °C kultiviert.

2.5 Lösungen und Medien für die Zellkultur

Alle für die Zellkultur verwendete Medien, Lösungen und Puffer wurden von der Firma GIBCO/Invitrogen bezogen. Das verwendete fötale Rinderserum (FCS) wurde zuvor 30 min bei 56 °C inaktiviert.

Kulturmedium für HepG2-Zellen

DMEM (Gibco#41965)

10 % FCS

1x Antibiotika/Antimykotika-Mix (Gibco#15240)

25 nM Na₂SeO₃

Kulturmedium für die Versuchsansätze für die HepG2-Zellen

DMEM (Gibco#41965)

1 % FCS

1x Antibiotika/Antimykotika-Mix (Gibco#15240)

25 nM Na₂SeO₃

Kulturmedium für Jurkat-Zellen

DMEM (Gibco#41965)

10 %FCS

1x Antibiotika/Antimykotika-Mix (Gibco#15240)

100 nM Na₂SeO₃

Kulturmedium für die Versuchsansätze für die Jurkat-Zellen

DMEM (Gibco#41965)

10 %FCS

1x Antibiotika/Antimykotika-Mix (Gibco#15240)

100 nM Na₂SeO₃

Beschichtungslösung für die Kultur von HepG2-Zellen

1 mg/ml Poly-L-Ornithin in H₂O (Sigma#P3655)

2.6 Antikörper

Anti-Glutathionperoxidase 4 (LabFrontier), LF PA0055, Kaninchen, polyklonal, 1:1000

Anti-Glutathionperoxidase 4 (Abcam), AB41787, Kaninchen, polyklonal, 1:1000

Anti-Glutathionperoxidase 1 (Thermo Scientific), PA5-30593, Kaninchen, polyklonal, 1:1000

Anti-Glutathionperoxidase 1 (LabFrontier), LF-PA0019, Kaninchen, polyklonal, 1:1000

Anti-Thioredoxin-Reduktase 1 (LabFrontier), LF-PA0023, Kaninchen, polyklonal, 1:1000

Anti-Thioredoxin-Reductase 1 (Thermo Scientific), PA5-28886, Kaninchen, polyklonal, 1:1000

Anti-HMG -CoA Reductase (Abcam), AB174830, Kaninchen, polyklonal, 1:200

Anti-Tubulin α (Sigma), T9026, Maus, polyklonal, 1:1000

Anti-GAPDH (Abcam), AB9482, Maus, polyklonal, 1:1000

2.7 Spezielle Chemikalien

22(R)-Hydroxycholesterol, Avanti Polar Lipids#700058P, Alabaster, USA

24(S)-Hydroxycholesterol, Enzo Life Sciences#BMLGR230-0001, Lörrach, DE

25-Hydroxycholesterol, Sigma Aldrich#H1015, Taufkirchen, DE

27-Hydroxycholesterol, Avanti Polar Lipids#700021P, Alabaster, USA

2.8 Geräte

Tabelle 3. Geräteverzeichnis

Agarosegel-Apparatur	Biometra
Brutschrank	Binder
Fluoreszenzphotometer, Fluoroscan Ascent FL	Thermo Scientific
Heizblock, ThermoMixer comfort	Eppendorf
Luminometer	Wallacinc., Perkinelmer
Mikroskop CKX41	Olympus
Mikrowellenofen	Progress
Multifuge	Heraeus
Nano Drop 1000	Peqlab
pH-Meter Sartorius	Thermo Scientific
Photometer, Multiscan SR	Thermo Scientific
Präparierbesteck	Fine Science Tools
Schüttler, IKA-Rocker	Faust
Sterilbänke	Heraeus
Thermozykler, iCycler	BioRad
Tischzentrifuge 5415	Eppendorf
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf
Trans-Blot-Blottingapparatur	BioRad
Ultraschallprozessor	Hielscher

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Die HepG2-Zellen wurden auf 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Die Schalen wurden zuvor mit einer Poly-L-Ornithin-(PLO)-Lösung (0,1 mg/ml in Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS)) für etwa 15 min bei Raumtemperatur (RT) beschichtet. Die Lösung wurde anschließend abgenommen und die Schalen wurden zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Die Kultivierung von HepG2-Zellen erfolgte in DMEM-Medium supplementiert mit 10 % FCS, 1x Antibiotikum/Antimykotikum-Mix, 25 nM Na_2SeO_3 in einem wasserdampfgesättigten Inkubator (Inkubator HERAcell 240i von Thermo Scientific) bei 37 °C und 5 % CO_2 . Bei einer Konfluenz von etwa 70 %-80 % wurden die Zellen mit 10 ml einer 0,1 % (w/v) Trypsin/0,02 % (w/v) EDTA-Lösung für 5 min inkubiert und mit 5 ml serumhaltigem Medium vom Schalenboden gespült. Nach einer Zentrifugation (4 Minuten) bei 1200 Umdrehungen (U) pro Minute wurde der Überstand abgezogen und das Zellenpellet in einem bestimmten Volumen frischen Kultivierungsmediums aufgenommen. Anschließend wurde die Lebendzellzahl bestimmt.

Die Jurkat-Zellen sind Suspensionszellen und wurden in 10 cm Zellkulturschalen mit 10 % FCS, 1x Antibiotikum/Antimykotikum-Mix, 25 nM Na_2SeO_3 in einem wasserdampfgesättigten Inkubator (Inkubator HERAcell 240i von Thermo Scientific) bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Bei einer Konfluenz von etwa 70 %-80 % wurden die Zellen passagiert, dazu wurde die Zellen-Suspension bei 1200 U für 4 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert. Vor jeder Passage erfolgte die Zellzahlbestimmung.

3.1.1 Bestimmung von Zellzahlen

Zellzahlen wurden mit einer Neubauer-Zellkammer bestimmt. Dazu wurden 50 μl der in DMEM aufgenommenen Zellen mit 50 μl Trypanblau-Lösung versetzt und leuchtende, lebende Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt.

3.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden mit Trypsin von der Schale gelöst, abzentrifugiert und in 1 ml serumhaltigem DMEM mit 10 % DMSO resuspendiert. Nach 72 Stunden konnten die Proben, die zuvor langsam auf 80 °C heruntergekühlt worden waren, in flüssigen Stickstoff überführt werden.

3.1.3 Behandlung von humanen Leberzellen

Als Standardmedium für alle Experimente in HepG2-Zellen wurde DMEM-Medium mit 1 % Serum, 25 nM Natriumselenit und Antibiotika/Antimykotika-Mix verwendet. Alle benutzten Platten und Schalen wurden zuvor mit poly-L-Ornithin (0,1 mg/ml) beschichtet. Dafür wurden diese mit einer poly-L-Ornithin-Lösung (2 ml) auf einem Schüttler für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die poly-L-Ornithin-Lösung abgenommen und die Platten zweimal mit PBS gewaschen.

Die Zellen wurden hierzu in jeweils 2 ml Medium in eine 6-well-Platten mit einer Zelldichte von etwa 250.000 Zellen/ml ausgesät. Nach einem Tag Inkubation (bei Konfluenz von etwa 50-60 %) wurden die Zellen mit den experimentellen Agentien wie z.B. Oxysterolen für zwei Tage behandelt. Da für alle Oxysterole Ethanol als Lösungsmittel diente, wurde die Kontrolle mit der gleichen Menge Ethanol, aber maximal mit 1 % (v/v) Ethanol behandelt. Anschließend wurden die Zellen durch Abschaben von der Schale in einem Lysispuffer (100 mM Tris-HCl, 0,5 % SDS, 10 % (w/v) Sucrose, pH 7,4 mit Tris/Tris HCl) geerntet.

3.1.4 Experimente mit humanen T-Lymphozyten (Jurkat-Zellen)

Für die Experimente mit Jurkat-Zellen wurde das gleiche Medium wie für die Kultivierung der Zellen gewählt (10 % FCS, Antibiotika/Antimykotika, 100 nM Natriumselenit). Diese nicht adhärenen Zellen wurden ebenfalls in 6-well-Platten mit einer Zelldichte von etwa 450.000 Zellen/ml ausplattiert und nach einem Tag mit Oxysterolen für zwei Tage behandelt. Da Jurkat-Zellen keine adhärenen Zellen sind, wurden die in einem Well schwimmenden Zellen abgenommen, in ein Falcon-Gefäß überführt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, und das Pellet in frischem Medium aufgenommen.

3.2 Cholesterolbestimmung

Der Cholesterolgehalt in Geweben und Plasma wurde mittels eines Cholesterol Assay Kits von Cayman#10007640 Chemicals Company durchgeführt. Stammlösungen wurden nach Angaben des Herstellers hergestellt. Der Test beruht auf einer enzymatischen Reaktion: Das freie Cholesterol wird durch die Cholesteroloxidase zu Cholest-4-en-3-on oxidiert, wobei auch H_2O_2 entsteht. Meerrettichperoxidase katalysiert dann die Reaktion von H_2O_2 mit 10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (ADHP); dabei entstehen Resorufin und H_2O . Resorufin fluoresziert nun stark; das Absorptionsmaximum liegt bei 563 nm, der Emissionspeak bei 587 nm.

Durch Zugabe des Enzyms Cholesterolesterase kann sowohl das freie Cholesterol als auch das Gesamtcholesterol (bestehend aus freiem Cholesterol und Cholesterolestern) detektiert werden. Zur Untersuchung des Gewebe-Cholesterols wurden Gewebe mit denaturierendem Lysispuffer (siehe Kapitel 2.1.2) versetzt, mechanisch homogenisiert und anschließend sonifiziert. Ein Teil des Lysats wurde zur Bestimmung des Proteingehalts entzogen. Jeweils 50 μ l eines Standards bzw. einer Probe wurden in eine 96-well-Platte pipettiert und mit der Reagenzlösung versetzt. Die Tests wurden bei 37 °C inkubiert, und nach 30 min wurde die Fluoreszenz (Excitation=530 nm, Emission=590 nm; Fluoroskan Ascent FL) gemessen.

Als Standard wurde eine Konzentrationsreihe von Cholesterol (0; 2; 4; 6; 8; 12; 16; 18; 20 μ M) herangezogen.

3.3 RNA-Isolierung

RNA wurde mit dem RNA-II-Kit von Macherey-Nagel aus den Zellen und Geweben isoliert. Das Prinzip der RNA-Isolierung basiert auf der Methode von Chomczynski et al. (1987).

Die Probe (etwa 2×10^6 Zellen bzw. 30 mg Gewebe) wird unter stark denaturierenden Bedingungen (350 μ l kommerzieller Lysispuffer, enthält chaotrope Substanzen + 3,5 μ l β -Mercapthoethanol) lysiert und homogenisiert.

Durch Zugabe von Ethanol werden dann optimale Bedingungen geschaffen, um RNA an eine Silikagel-Säule zu binden. Nach mehreren Waschschritten wird die RNA mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser bei 60 °C eluiert. Die isolierte RNA wurde sofort auf Eis gekühlt und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

Die Quantifizierung der Menge an gewonnener RNA erfolgte an einem NanoDrop 1000 (peqlab). Für die RNA-Quantifizierung genügten dabei 2 μ l einer Lösung. Die RNA-

Konzentration wird durch Absorptionsmessung bei der Wellenlänge 260 nm bestimmt. Eine Absorptionseinheit A260 entspricht ungefähr 40 µg RNA/ml. Daraus ergibt sich die Berechnung: $c[\text{ng RNA}/\mu\text{l}] = A260 \times 40$

Parallel wurde die Absorption der Proteine (280 nm) gemessen, um die Reinheit der RNA-Proben zu überprüfen. Daraus ergibt sich ein Absorptionsquotient 260/280, der etwas über die Reinheit der Probe aussagt: Er sollte etwa bei 1,9-2,2 liegen. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

3.4 cDNA-Synthese, reverse Transkription

Die gewonnenen RNA-Proben wurden mit einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde ein QuantiTect Reverse Transkription Kit der Firma Qiagen verwendet. Alle Reagenzien wurden nach Vorgabe im Herstellprotokoll zusammengefügt.

In einem 0,5 ml Eppendorffgefäß wurden folgende Lösungen nach Vorgabe im Herstellprotokoll zusammengegeben und sanft vermischt.

Pipettierschema der isolierten RNA

Puffer 7	2 µl
RNA	variabel (Endkonzentration 1 µg)
<u>RNase-freies Wasser</u>	<u>variabel</u>
Gesamtvolumen	14 µl

Die Mischung wurde bei 42 °C für 2 min inkubiert und dann auf Eis platziert

Pipettierschema des Master-Mixes zur reversen Transkription der isolierten RNA

Master Mix (enthält Reverse Transkriptase)	1 µl
Puffer 5	4 µl
Primer-Mix	1 µl
<u>RNA-Mix (siehe oben)</u>	<u>14 µl</u>
Gesamtvolumen	20 µl

Bei 42 °C wurde die verdünnte RNA für 2 min denaturiert und dann auf Eis abgekühlt. Dadurch werden die Sekundärstrukturen von der RNA aufgeschmolzen. Danach wurden die

restlichen notwendigen Reagenzien dazugegeben (siehe oben) und bei 37 °C für 60 min (Arbeitsoptimum von der Reverse Transkriptase) die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Die so entstandene cDNA wurde auf 4 °C abgekühlt und bis zum weiteren Ansatz vorübergehend bei -20 °C gelagert.

3.5 Real-Time RT-PCR

Real-Time RT-PCR ist eine Form der Vervielfältigungsmethode Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und erlaubt die direkte Detektion des PCR-Produktes über einen Fluoreszenzfarbstoff (SYRBP Green). Dieser Cyanin-Farbstoff interkaliert generell in jede doppelsträngige DNA und absorbiert im Farbstoff-DNA-Komplex blaues Licht (494 nm). Die Emission der Fluoreszenz steigt sich proportional mit jedem Vervielfältigungszyklus und kann im grünen Bereich bei 521 nm gemessen werden. Die Fluoreszenz wird in der exponentiellen Phase der PCR gemessen und als Ct-Wert ausgedrückt. Der Ct-Wert ist eine zentrale Größe in der RT-PCR und beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Das heißt: Je größer der Ct-Wert ist, desto kleiner ist die Ausgangsmenge an DNA.

Die Quantifizierung der Zielgene erfolgte somit relativ ($\Delta\Delta C_t$ -Methode). Es wurde zuerst die Existenz von einem Haushaltsgen (z.B. Tubulin) postuliert und angenommen, dass die Expression dieses Gens in jeder Zelle konstant und stabil sei. Auf dieses Haushaltsgen wurden dann die Werte der Zielgene bezogen.

Für die Durchführung wurde ein Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen) herangezogen.

Pipettierschema für die RT-PCR:

TaqPCR Master Mix	12,5 μ l
Vorwärts-Primer	0,1 μ l (100 pmol/ μ l) oder 1 μ l (10 pmol/ μ l)
Rückwärts-Primer	0,1 μ l (100 pmol/ μ l) oder 1 μ l (10 pmol/ μ l)
RNase-freies Wasser	variabel
<u>cDNA</u>	<u>1 μl</u>
Gesamtvolumen	25 μ l

Der Mix (25 μ l) wurde in allen Wells vorgelegt. Pro Gen wurden dann ein Triplikat und eine Leerkontrolle ohne cDNA pipettiert.

Programm für die RT-PCR

Cycle 1: x1

Schritt 1: 95 °C 2:00 min (Aktivierung)

Cycle 2: x35 (Amplifikation)

Schritt 1: 95 °C 00:30 min (Aufkochen)

Schritt 2: 60 °C 00:30 min (Primer-Bindung)

Schritt 3: 72 °C 00:30 min (Elongation)

Cycle 3: x1

Schritt 1: 72 °C 10:00 min (finale Elongation)

Cycle 4: x1

Schritt 1: 4 °C (Abkühlung)

3.5.1 Überprüfung der Produkte der qPCR mit einer Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese kann die Produktspezifität anhand der Länge des Amplifikats geprüft werden. Dazu wurde ein 2 % Agarose-Gel (w/v) in TAE-Puffer unter Zusatz von Ethidium-Bromid (etwa 10 µl auf 10 ml Gel) gegossen. TAE-Puffer wurde auch als Laufpuffer benutzt. Die Proben wurden mit einem 10x Orange-G-Ladepuffer (50 % Glycerin, 0,5 % Orange G) versetzt und aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung von 80 V wanderten die negativ geladenen Proben zur Anode. Die Banden wurden dann unter UV-Licht detektiert. Als Standard diente 1 µl des DNA-Markers MassRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific) mit Fragmentlängen von 80 bis 10000 Basenpaaren.

3.6 Protein-Analyse

3.6.1 Protein-Isolation

Die adhärennten HepG2-Zellen wurden in 6-well Platten kultiviert und dann mit unterschiedlichen Konzentrationen von Oxysterolen für 48 h inkubiert. Bei einer Konfluenz von 70 %-80 % wurden sie mit einem eiskalten Lysispuffer (100 mM Tris HCl, 0,5 % SDS, 10 % (w/v) Sucrose, pH7,4 mit Tris/Tris HCl), der zusätzlich 1x Proteaseinhibitor-Cocktail enthielt, ge-

erntet. Dazu wurden die Zellen mit einem Zellspatel (TPP) von der Zellschale abgeschabt (siehe Kapitel 3.1.3). Die gewonnenen Proben wurden sonifiziert und bei -20 °C aufbewahrt.

Jurkat-Zellen wurden nach der Behandlung für 48 h bei Standardbedingungen kultiviert (siehe Kapitel 3.1.4). Anschliessend wurden die in einem Well schwimmenden Zellen abgenommen, in ein Falcon-Gefäß überführt und bei 1200 U für 4 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, und das Pellet in eisklatem denaturierendem Lysispuffer (100 mM Tris HCl, 0,5 % SDS, 10 % (w/v) Sucrose, pH7,4 mit Tris/Tris HCl), der zusätzlich 1x Proteaseinhibitor-Cocktail enthielt, aufgenommen.

Maus-Gewebe (Cortex, Cerebellum, Herz, Lunge, Hoden, Skelettmuskulatur, Niere, Leber) wurden entnommen und in ein auf -80 °C abgekühltes Eppendorfgefäß überführt. Die Gewebe wurden nach Ende der Präparation in einem Verhältnis von ungefähr 100 mg Gewebe/600 µl in Lysispuffer wie oben aufgenommen und mit einem Plotter (Potter S, Sartorius) homogenisiert.

Alle Gewebslysate wurden sonifiziert und anschließend die Proteinmenge quantifiziert.

3.6.2 Protein-Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Proteinmengen wurde die Bicinchoninsäure-Methode (BCA-Methode) herangezogen, der eine Biuret-Reaktion zugrunde liegt. Die Reaktion beruht auf der Komplexbildung von Proteinen mit zweiwertigen Kupferionen. Der farbige Komplex kann photometrisch bei 562 nm gemessen werden.

Etwa 2-5 µl der Probenlysate wurden mit einer frisch angesetzten BCA-2 %-Kupfer-Lösung, bestehend aus einem Carbonatpuffer mit BCA (Lösung A, 98 %) und einer CuSO₄-Lösung (Lösung B, 2 %), im Verhältnis 1:20 versetzt und nach 30 min Inkubation (60 °C) bei 560 nm Absorption am Multiskan Photometer RC (Thermo Labsystem) gemessen. Als Standard diente eine Konzentrationsreihe von bovinem Serumalbumin. Die Proben wurden entsprechend verdünnt, wenn zu viel Protein zu erwarten war.

3.6.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Trennung von Proteingemischen wurde eine der gebräuchlichsten Methoden, die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli, herangezogen. Hierbei werden die Protein-Komponenten nach ihrer Molekülgröße getrennt. Das Polyacrylamidgel (10-15 %) besteht aus

einem Sammel- und einem Trenngel. In einem großporigen Sammelgel werden die Proteine aufkonzentriert, und im Trenngel dann nach Größe aufgetrennt. Durch Erhitzen (95 °C, 3 min) in einem reduzierenden Ladepuffer (5 mM Tris-HCl, 2 % (w/v) SDS, 10 % (w/v) Glycerol, 0,005 % (w/v) Bromphenolblau, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol) werden alle Proben zunächst denaturiert und mit einer negativen Ladung abgesättigt, sodass die Eigenladung überdeckt wird und die Wanderungsgeschwindigkeit nur noch durch das Molekulargewicht bestimmt wird. Die auf die gleiche Proteinmenge von 10-25 μ g normierten Proben wurden anschließend in die Geltaschen geladen. Als Größenstandard wurde der peqlabGold Proteinmarker IV (peqlab) verwendet.

Pipettierschema für ein Polyacrylamidgel

Laufgel; 10 %; 1,5 mm Dicke

40 % Acrylamid (ml)	2,25
1,5 M Tris pH 8,8 (ml)	3,42
SDS 20 % (in ddH ₂ O) (μ l)	45
H ₂ O (ml)	3,29
APS 10 % (in ddH ₂ O) (μ l)	90
Temed (μ l)	5,63

Sammelgel; 4 %; 1,5 mm Dicke

40 % Acrylamid (ml)	0,375
0,6 M Tris pH 6,8 (ml)	0,469
SDS 20 % (in ddH ₂ O) (μ l)	18,75
H ₂ O (ml)	2,85
APS 10 % (in ddH ₂ O) (μ l)	37,5
Temed (μ l)	3

3.6.4 Western-Blot

Im Western-Blot werden die in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen, auf der die immobilisierten Proteine dann angefärbt oder mit spezifischen Antikörpern behandelt werden können. Es wurde ein sogenanntes Sandwich, bestehend aus zwei Schwämmchen, Whatmanpapier einer Membran und dem Gel zusammengebaut und in einer

Kammer (Bio-Rad) mit Transferpuffer (siehe Kapitel 2.1.2) platziert. Der Transferpuffer enthielt eine bestimmte Methanoldmenge (20 %), um die Oberflächen der Nitrocellulose-Membran adsorptiver zu machen und eine optimale Übertragung der Proteine zu gewährleisten.

Der Proteintransfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 30 V über 16-24 Stunden. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Membran mit Ponceau S-Lösung (0,2 % (w/v) Ponceau S, 5 % (v/v) Essigsäure in H₂O) angefärbt; nach Entfärbung des Hintergrundes mit H₂O wurden rote Proteinbanden sichtbar.

3.6.5 Nachweis von Proteinen nach Blotting mittels Antikörpern (Immunoblot)

Die Membran wurde zunächst für 30 min mit 2 % Magermilch (2 % (w/v) Magermilchpulver in 1x TBS-T) behandelt, wodurch die proteinfreien Bereiche abgesättigt wurden, um unspezifische Bindungen des primären Antikörpers zu vermeiden. Nach mehrfachem Waschen mit TBS-Tween-Lösung (1x TBS, 0,005 % (v/v) Tween 20, pH 7,4 mit NaOH) (3x 15 min) bei Raumtemperatur wurde die Membran mit einem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in TBS-Tween mit 0,005 % NaN₃ angesetzt. Vor der Inkubation mit dem sekundären Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörper für 2 Stunden wurde die Blotmembran dreimal je 15 min mit TBS-Tween gewaschen. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die Membran mit 2 ml Luminol-Entwicklungslösung, bestehend aus 1,8 ml Lösung A (Luminol-haltig), 190 µl Lösung B und 10 µl 30 % H₂O₂ behandelt (siehe Kapitel 2.1.2). Der Blot wurde in einem Dunkelkammer-Dokumentiersystem (peqlab) entwickelt. Für die Quantifizierung der gespeicherten Signale wurde das frei verfügbare Programm ImageJ verwendet.

3.7 Präparation von Mausgeweben

Zur Entnahme der Gewebe wurden Mäuse mit Isofluran (FORENE®, Abbvie) anästhesiert, mit einer Guillotine getötet und mit sterilen Instrumenten präpariert. Einzelne Gewebestücke wurden in sterile Eppendorf-Gefäße überführt, zwischenzeitlich auf Trockeneis gelagert und anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

3.8 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden wiederholt durchgeführt. Die erhobenen Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen in den jeweiligen Abbildungen dargestellt.

Für die Bestimmung der statistischen Signifikanz der zwei unabhängigen Proben wurde ein t-Test verwendet. Die statistische Auswertung der Experimente mit mehr als zwei unabhängigen Stichproben wurde mittels One-Way ANOVA unter Verwendung von Sigma Plot 12.3 (Systat Software) ermittelt. Die verwendeten statistischen Methoden und Signifikanz sind in der Abbildungslegende angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Auswirkungen von Oxysterolen auf die Selenoprotein-Expression in klonalen Hepatozyten

Die Leber nimmt in der Cholesterol- und Selenoprotein-Biosynthese eine zentrale Stellung ein. Es war somit naheliegend, die hypothetische Verknüpfung zwischen beiden Pfaden in einem Zellsystem wie klonalen Hepatozyten (HepG2, human hepatocellular carcinoma) zu testen. Dr. Andrea Kromer konnte in ihrer Dissertation (Kromer et al. 2009) anhand von Statinen experimentellen Zusammenhänge beider Synthesen zeigen. Dafür waren Hepatozyten mit Statinen unterschiedlicher Konzentration behandelt und ihr Einfluss auf die Selenoprotein-Synthese untersucht worden. Daher wurden die Kultivierungsbedingungen (10 % FCS, 25 nM Selenit) für HepG2-Zellen aus der Arbeit von Dr. Andrea Kromer übernommen (Kromer et al. 2009). Die Experiment-Bedingungen (1 % FCS, 25 nM Selenit) wurden jedoch in mehreren Versuchen optimiert, um die Hintergrund-Cholesterol-Konzentration im Medium zu verringern.

4.1.1 Selenoprotein-Expression nach Oxysterolbehandlung

Oxysterole werden im Organismus entweder endogen gebildet oder über die Nahrung aufgenommen. Die enzymatisch gebildeten Oxysterole spielen eine große Rolle bei der Cholesterolhomöostase und damit eventuell auch in der Selenoprotein-Biosynthese (Kapitel 1.6).

Die hier verwendeten Oxysterole unterscheiden sich nicht nur in ihrer chemischen Struktur, sondern auch in ihrer physiologischen Bedeutung. 25-Hydroxycholesterol ist ein in der Literatur viel beschriebenes Oxysterol, das in der Inhibition der Cholesterolbiosynthese wirksam ist. 27-Hydroxycholesterol fungiert als Hauptvorstufe der Gallensäuren und spiegelt den Cholesterolgehalt in der Zelle wider. 24(S)-Hydroxycholesterol wird im Gehirn gebildet und in Zusammenhang mit neurogenerativen Erkrankungen gebracht. 22(R)-Hydroxycholesterol ist von allen endogenen Oxysterolen das bis jetzt am wenigsten erforschte Oxysterol. In der Literatur ist 22-Hydroxycholesterol als Ligand mit hoher Affinität zu den nukleären Rezeptoren Leber-X-Rezeptor- α (LXR α) und Leber-X-Rezeptor- β (LXR β) beschrieben (Vaya J et al. 2007; Boyd et. al. 2001).

Das endogen synthetisierte 22(S)-Hydroxycholesterol kann als Regulator von SREBP1 die Lipogenese und Lipidakkumulation in Hepatozyten und Muskelzellen reduzieren. Damit

könnte das 22 (S)-Hydroxycholesterol eine mögliche Anwendung bei metabolischen Krankheiten wie Diabetes mellitus finden. Andere Literaturdaten zeigten inhibitorische Eigenschaften gegenüber der HMG-CoA-Synthase von 22(R)-Hydroxycholesterol (Ando et al. 2004) und gegenüber der HMG-CoA-Reduktase (HMGCR) von dem substituierten 22(S)-Hydroxycholesterol (Chorvat et al. 1985). Alle beschriebenen Oxysterole sind löslich genug, um von den Zellen über Transporter oder Diffusion aufgenommen zu werden.

Die HepG2-Zellen wurden in einem 1 % FCS- und 25 nM Selenit-haltigen Medium ausplattiert und nach einem Tag mit Oxysterolen unterschiedlicher Konzentration für 48 Stunden inkubiert.

Wie aus Abbildung 6 zu entnehmen ist, zeigten die Oxysterole ein unterschiedliches Verhalten gegenüber den Selenoproteinen. 22- und 25-Hydroxycholesterol unterdrückten die Selenoprotein-Synthese der GPx4, im Falle von 25-HC auch signifikant. 22-Hydroxycholesterol verringerte die Gpx1-Spiegel bei Behandlung mit der höchsten Dosis von 25µM, jedoch wurde keine statistische Signifikanz in dem Fall angenommen. Der TrxR1-Level war sichtbar bei einer geringeren Konzentration von 5 µM durch 22-HC nach unten reguliert, höhere Konzentrationen haben aber schließlich das Gegenteil bewirkt. Es handelt sich vermutlich bei diesem Effekt um ein Artefakt.

Höhere Konzentrationen (50 µM) von 25-HC haben sich in Leberzellen als toxisch erwiesen.

Im Gegensatz zu oben genannten Oxysterolen blieben Selenoproteine nach der Behandlung mit 24- und 27-Hydroxycholesterolen statistisch unbeeinflusst. Diese Beobachtungen sind nicht völlig widersprüchlich, wenn man die Aufgaben der einzelnen Oxysterole in der Leber berücksichtigt.

Das Molekulargewicht der untersuchten Proteine lag für TrxR1 bei 55 kDa, für GPx4 bei 19-20 kDa und 22 kDa für GPx1. TrxR1 zeigte sich in Form einer dreifachen Bande, was mit mehreren TrxR1-Isoformen zu erklären ist.

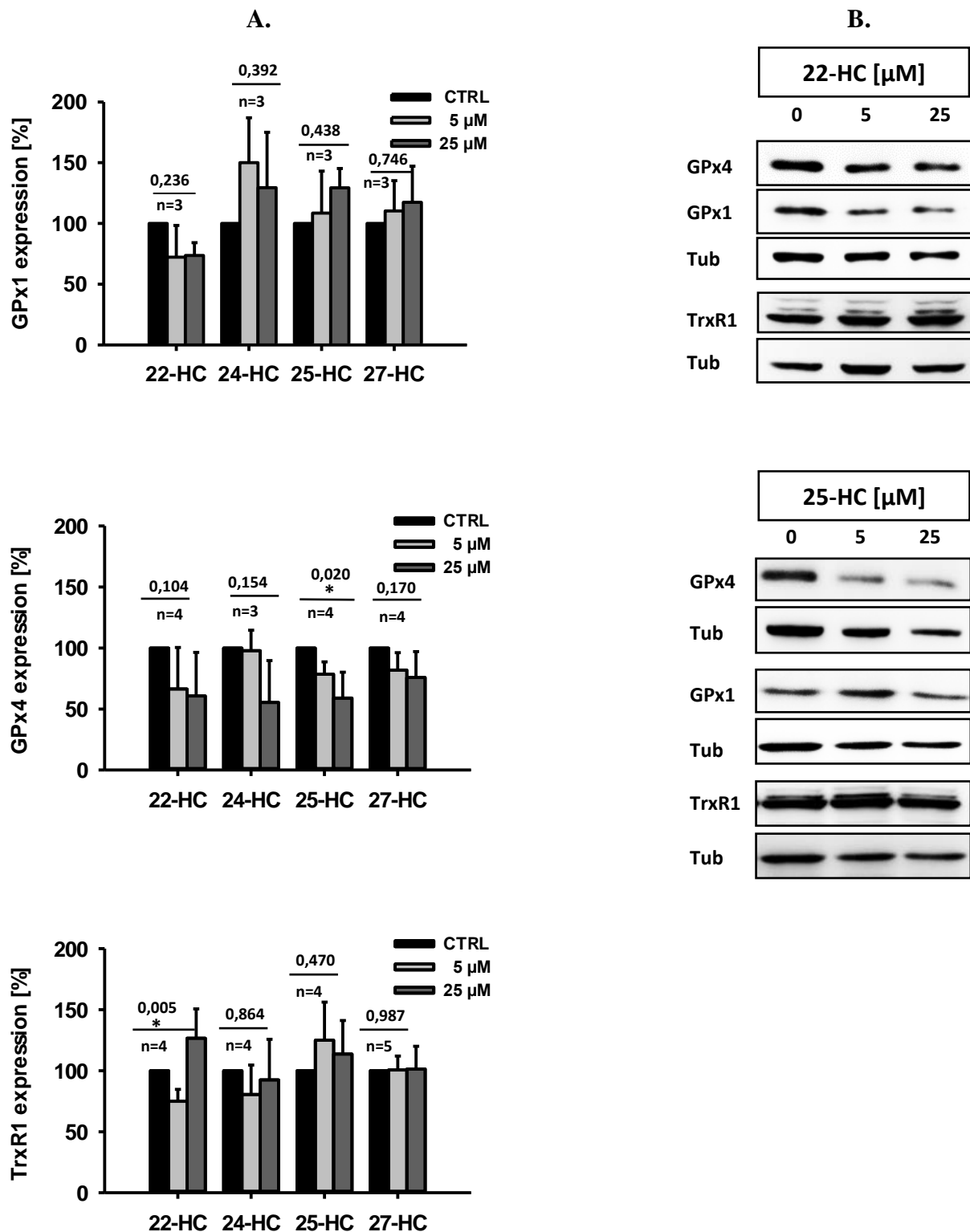


Abbildung 6. Western-Blot-Analyse der Selenoproteine nach der Inkubation mit vier unterschiedlichen Oxysterolen in HepG2-Zellen

Die Graphen (A) zeigen die densitometrische Auswertung von Western-Blots nach der Behandlung mit unterschiedlichen Oxysterolen. Alle ermittelten Werte wurden auf Tubulin normiert. Es wurden 15 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen aus mindestens drei Experimenten, die Zahl ist als n angegeben. p-Werte sind als Zahl über die waagerechte Linie angegeben; * $p < 0.05$, One-Way ANOVA. Die exemplarischen Blots (B) zeigen die Expression der Selenoproteine nach der Behandlung mit zwei Oxysterolen (22-HC, 25-HC) unterschiedlicher Konzentrationen (5 µM, 25 µM) für zwei Tage.

4.1.2 Auswirkung der Behandlung mit 22- und 25-Hydroxycholesterol auf die transkriptionelle Regulation von Selenoproteinen

Eine Rolle des Cholesterols oder der Oxysterole bei der Selenoprotein-Synthese ist bislang nicht beschrieben. Aus dem ersten Experiment in Abb. 6 ist eine Unterdrückung der GPx4 durch 22- und 25-Hydroxycholesterol zu entnehmen. Diesem Effekt wurde weiter nachgegangen, um einen molekularen Mechanismus zu beschreiben.

Wie im Abschnitt 1.2 aufgeführt, wird das Intermediärprodukt Isopentenylpyrophosphat für die post-transkriptionelle Modifikation der Selenocystein tRNA und damit für die Synthese der Selenoproteine benötigt (Fradejas et al. 2013). Ob die Verringerung der GPx4 nach der Oxysterolinkubation transkriptionell oder auf späterer Ebene erfolgte, sollte im folgenden Versuch geprüft werden. Dazu wurde eine RT-PCR-Analyse der mit Oxysterolen inkubierten HepG2-Zellen durchgeführt und die Transkription der drei Selenoprotein-Gene untersucht. Da die HMG-CoA-Reduktase sowohl durch Cholesterole selbst als auch durch Oxysterole reguliert wird, wurde die Transkription dieses Gens auch untersucht.

Für die PCR wurde RNA aus Hepatozyten, die für 2 Tage mit 22-HC oder 25-HC (25µM) behandelt worden waren, isoliert. Nach dem Umschreiben der RNA in cDNA, wurde die RT-PCR durchgeführt und mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode quantifiziert.

Im Gegensatz zu 22-HC folgte das 25-HC dem kanonischen Weg und unterdrückte die Transkription der HMG-CoA-Reduktase. Dagegen blieb die Transkription aller Selenoproteine nach der Inkubation mit beiden Oxysterolen unverändert (Abb. 7). Der mRNA-Spiegel der GPx4 war sowohl bei der Behandlung mit 22-HC als auch mit 25-HC erhöht, wobei dies nicht statistisch signifikant war. Das könnte auf eine gegenregulatorische Antwort auf eine reduzierte Proteinexpression der GPx4 hinweisen.

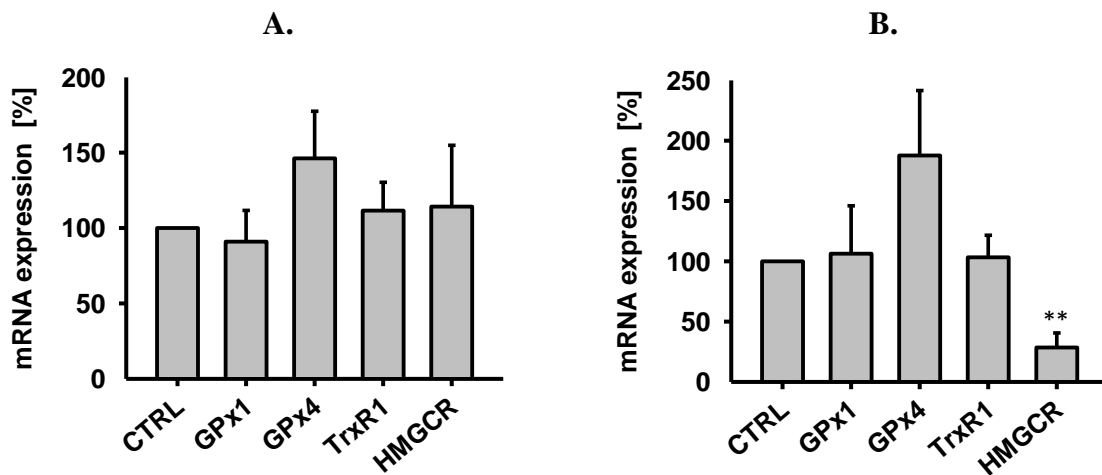


Abbildung 7. RT-PCR-Analyse von HepG2-Zellen nach der Inkubation mit 25 µM 22-HC (A) und 25-HC (B)

Die HepG2-Zellen wurden in einem 1 % FCS/25 nM Selenit-haltigen Medium ausgesät und für zwei Tage mit 25 µM an Oxysterolen inkubiert. Als Referenzgen wurde Tubulin gewählt und die Expression anderer Gene (Gpx1, Gpx4, TrxR1, HMGCR) darauf normiert. Alle Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten (**p < 0.01; t-Test).

Zusammenfassend wurde die Proteinexpression von GPx1 und GPx4 durch 22-HC und zum Teil auch durch 25-HC unterdrückt. Da aber die Transkription dieser Gene unverändert blieb, könnte dieses Resultat auf eine fehlende post-transkriptionelle Modifikation der Sec-tRNA hindeuten.

4.1.3 Selenoprotein-Expression nach Oxysterolbehandlung in einem Serum-freien Opti-MEM-Medium.

Bis jetzt wurden alle Experimente in HepG2-Zellen in einem 1 % FCS-haltigen Medium durchgeführt. Jedoch könnte Wirkung von 22-HC und 25-HC durch das im FCS vorhandene Cholesterol abgeschwächt gewesen sein.

Deswegen wurde versucht, den vorher beobachteten Effekt von Oxysterolen unter absolut cholesterolfreien Bedingungen zu testen. Die Hepatozyten wurden dazu in einer 12-Well-Platte ausgesät und nach einem Tag mit 25-HC in unterschiedlichen Konzentrationen, behandelt. Als Medium wurde nun ein Serum-freies Opti-MEM (Gibco#31985-047) verwendet.

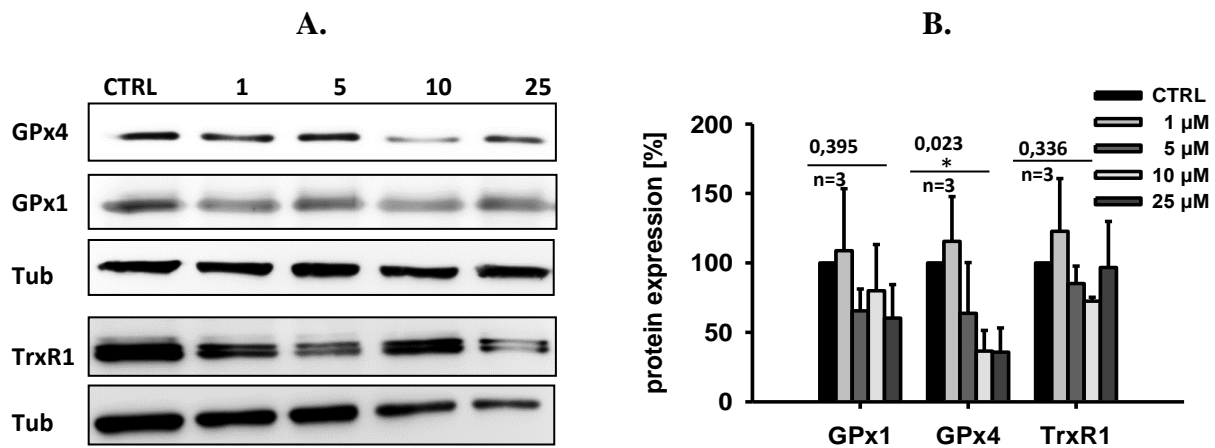


Abbildung 8. Western-Blot-Analyse der HepG2-Zellen nach Inkubation mit 25-HC.

Alle Experimente wurden in einem Serum-freien Medium (Opti-MEM), supplementiert mit 25 nM Selenit, durchgeführt. Die Behandlungszeit betrug 2 Tage. Die Abbildung zeigt Western Blot (A) und die densitometrische Auswertung (B) dreier Experimente. Es wurden 15 µg Gesamtprotein aufgetragen (* $p < 0.05$, One-Way ANOVA).

Das Ergebnis in Abbildung 8 zeigt, dass 25-HC auch hier die Expression von GPx4 signifikant senkte. Die Expression des Proteins wurde bei den höchsten Konzentrationen (10 µM und 25 µM) auf ca. 30 % gesenkt. Für GPx1 war eine sichtbare verringerte Expression zu beobachten, wobei TrxR1 auch hier unverändert blieb.

Der durchgeführte Versuch macht deutlich, dass die höheren Dosen von 25-HC in einem serumfreien Medium effektiver als in einem 1 % FCS-haltigen Medium waren. Der Effekt war stabiler und besser reproduzierbar, was sich in geringeren Standardabweichungen zeigte.

4.2 Einfluss von Oxysterolen auf die Selenoprotein-Expression in klonalen T-Lymphozyten

Um auszuschließen, dass die Auswirkungen von 22-HC und 25-HC auf die Selenoprotein-Synthese ausschließlich zellenspezifisch (HepG2) waren, wurden die gleichen Versuche in humanen klonalen T-Zellen (Jurkat-Zellen) durchgeführt.

Die Supplementation mit Selen in vivo hat antioxidative, antibakterielle und immunmodulatorische Eigenschaften. Selen ist essenziell für die Proliferation und Aktivierung von T-Lymphozyten. Der genaue Mechanismus, wie das Element Selen in der Zellproliferation involviert ist, ist aber unbekannt (Saito et al. 2003).

Auch in T-Lymphozyten spielt der Mevalonatweg eine wichtige Rolle. Im Vergleich zu Hepatozyten wird er aber vermehrt zur Produktion von Zwischenprodukten wie Isopreneinheiten

genutzt. Es wurde bereits gezeigt, dass Statine die Aktivierung und Proliferation von Jurkat-Zellen unterdrücken, indem sie die Entstehung von Isoprenen durch die Hemmung der Vorstufe Mevalonat verringern (Ghittoni et al. 2005). Aufgrund der fehlenden Prenylierung von bestimmten Proteinen (z.B. GTPasen) geht deren Funktionalität verloren. Dadurch werden viele Signalwege in diesen Zellen ausgeschaltet, und die Aktivität der T-Lymphozyten geht teilweise verloren (Ghittoni et al. 2005).

T-Lymphozyten sind Suspensionszellen. Im Gegensatz zu Hepatozyten wurden die T-Zellen in einem 10 % FCS 100 nM Selenit-haltigen Medium kultiviert. Die Experiment-Bedingungen entsprachen den Kultivierungsbedingungen, da sie bei 1 % FCS nicht überlebten.

Die Zellen wurden in Schalen kultiviert und in 6 Well-Platten überführt. Nach einem Tag (bei Konfluenz von etwa 50-60 %) wurden sie mit Oxysterolen unterschiedlicher Konzentration (0; 5 μ M; 25 μ M) behandelt und nach 48 Stunden geerntet. Nach der Proteinquantifizierung wurden die Zellysate per Western Blot analysiert. Abbildung 9 zeigt die Resultate.

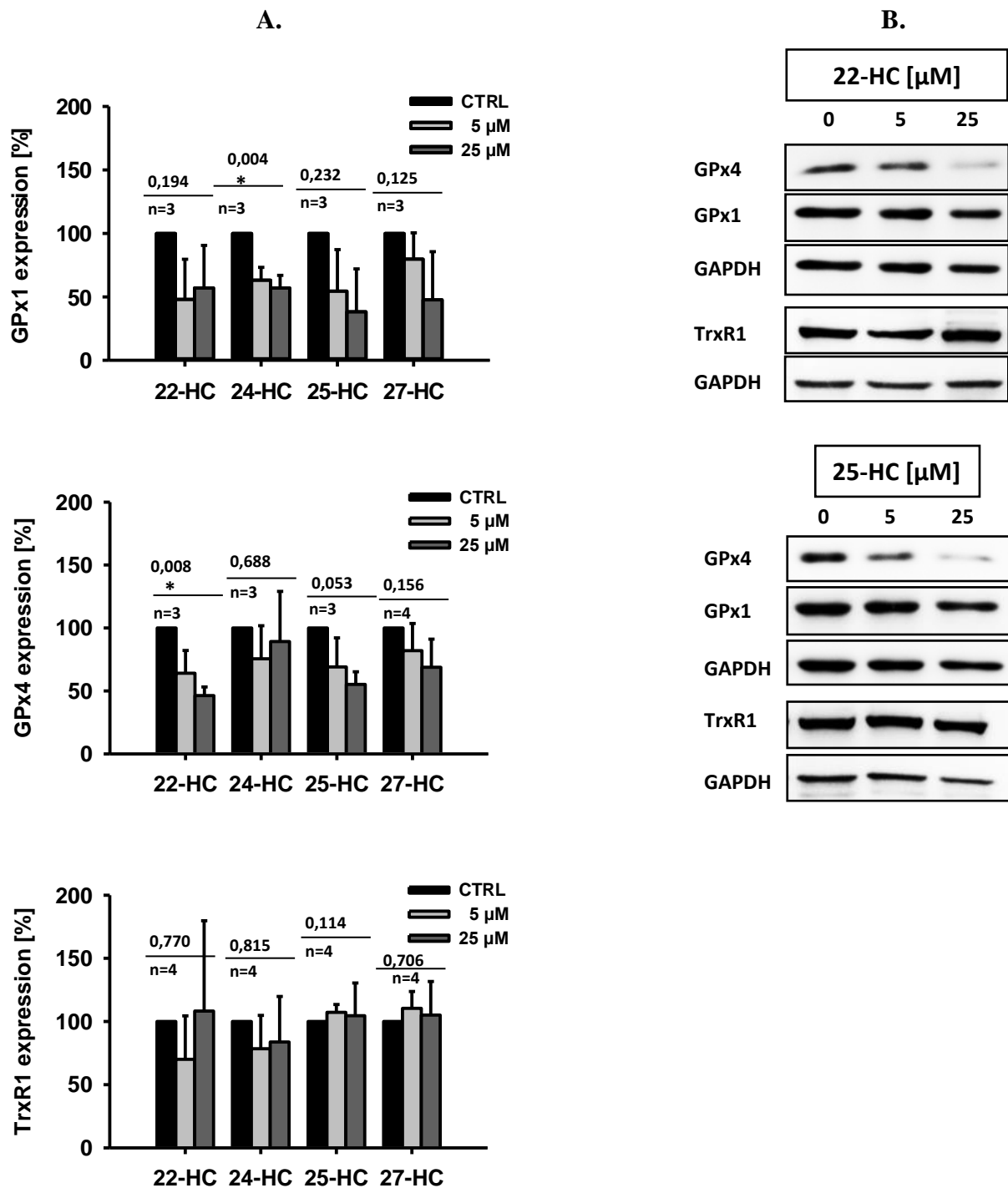


Abbildung 9. Western-Blot-Analyse der Selenoproteine nach der Behandlung mit Oxysterolen in Jurkat-Zellen.

Jurkat-Zellen wurden mit Oxysterolen in unterschiedlicher Konzentration für zwei Tage behandelt. Die Graphen (A) zeigen die densitometrische Auswertung von Western-Blots nach der Behandlung mit unterschiedlichen Oxysterolen. Alle ermittelten Werte wurden auf GAPDH normiert. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen aus mindestens drei Experimenten, die Zahl ist als n angegeben. p-Werte sind als Zahl über die waagerechte Linie angegeben; * $p < 0.05$, One-Way ANOVA. Die exemplarischen Blots (B) zeigen die Expression der Selenoproteine nach der Behandlung mit zwei Oxysterolen (22-HC, 25-HC) unterschiedlicher Konzentrationen (5µM, 25µM) für zwei Tage.

Alle Oxysterole zeigten eine ähnliche Auswirkung auf der GPx1-Ebene, welches um etwa 40 % reduziert wurde. Nur bei 24-HC war der Effekt jedoch statistisch signifikant. Die TrxR1-Expression blieb erwartungsgemäß völlig unverändert. TrxR1 ist ein Haushalts-Protein, das konstant exprimiert wird und auch nicht so sensitiv gegenüber einem Selenmangel ist, wie die GPx-Klasse (Pappas et al. 2008). Die GPx4-Expression wurde insbesondere durch 22-HC und 25-HC verringert, wobei 22-HC eine Signifikanz erreichte.

Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass Oxysterole in Jurkat-Zellen ein ähnliches Verhalten gegenüber den Selenoproteinen wie in HepG2-Zellen zeigten. Interessanterweise waren hier einige Effekte, trotz des 10 % FCS-haltigen Mediums sogar noch deutlicher. Ob hinter diesen Effekten der gleiche Mechanismus agierte, sollte in den folgenden Experimenten geklärt werden.

4.3 Transkriptionelle Effekte einer Inkubation mit 22- und 25-Hydroxycholesterol

Aus der Western-Blot-Analyse in Jurkat-Zellen ergaben sich zwei Oxysterol-Kandidaten, die die GPx4-Expression gegenüber den unbehandelten Zellen deutlich senkten. Dies wurde auf der transkriptionellen Ebene weiter untersucht. Die Zellen wurden dazu mit 25 μ M 22- bzw. 25-HC behandelt und nach 2 Tagen in einem stark denaturierenden Puffer geerntet. Aus den Proben wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Transkription dreier Selenoprotein-Gene und der HMGCR untersucht.

Wie aus Abbildung 10 zu entnehmen ist, blieb die Transkription aller Gene bei der Behandlung mit 22-HC unbeeinflusst. Eine leichte Steigerung war bei TrxR1 und HMGCR zu beobachten, die aber keine Signifikanz erreichte. Im Falle von 25-HC war eine leichte doch statistisch signifikante Erhöhung der GPx4-mRNA zu sehen.

Diese Ergebnisse zeigen einen post-transkriptionellen Effekt der Hydroxycholesterole auf die GPx4-Expression an und legen nahe, dass die veränderte GPx4-Expression möglicherweise auf ein Fehlen der Sec-tRNA-Modifikation zurückzuführen ist.

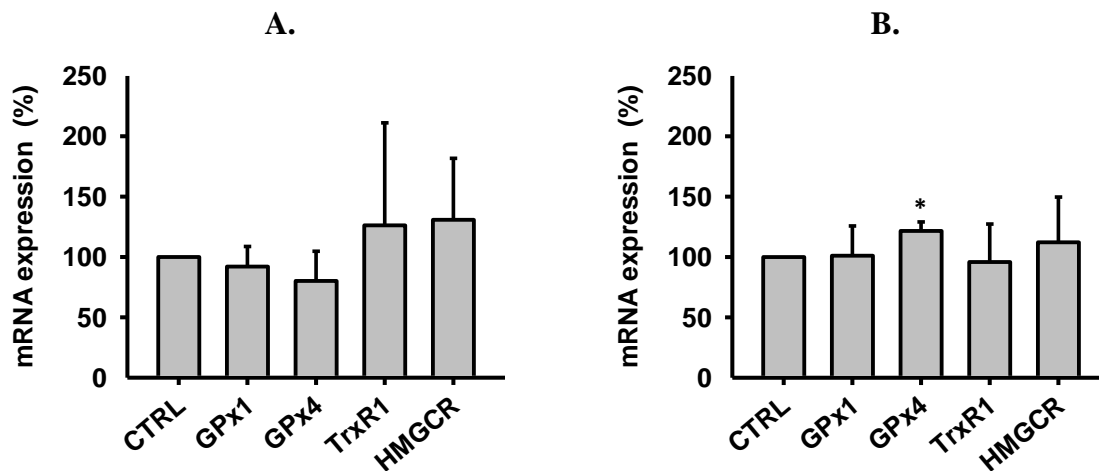


Abbildung 10. m-RNA-Spiegel der untersuchten Gene in Jurkat-Zellen nach der Behandlung mit 25 µM 22-(A) bzw. 25-HC (B).

Die Zellen wurden für zwei Tage in einem 10 % FCS 100 nM Selenit-haltigen Medium mit Oxysterolen (25µM) inkubiert, nach zwei Tagen geerntet und die RNA aus den Proben isoliert. Nach dem Umschreiben in cDNA wurde eine RT-PCR-Analyse durchgeführt. Alle Werte wurden auf ein Referenzgen (GAPDH) bezogen. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$ versus CTRL; t-Test).

In Jurkat-Zellen induzierte keines der Oxysterole dem kanonischen Weg der Cholesteroregulation; die Transkription des HMGCR-Gens blieb unverändert. Deswegen wurden weitere Experimente durchgeführt, um die regulatorischen Effekte von Oxysterolen auf die Selenoproteine zu erklären.

Die HMG-CoA-Reduktase spielt eine zentrale Rolle in der Cholesterolsynthese und-regulation, wird aber selbst auch komplex reguliert, einschließlich der m-RNA Synthese, der Translation, der Protein-Degradation und der Enzymaktivität. Cholesteroll kann über den negativen Rückkopplungsmechanismus die HMGCR Genexpression hemmen, die Aktivität des Enzyms wird aber auch über Phosphorylierung (inaktive Form) und Desphosphorylierung (aktive Form) reguliert (Burg et al. 2011). Aufgrund der fehlenden transkriptionellen Regulation des HMGCR-Gens konnten die Effekte beider Oxysterole vorerst nicht erklärt werden. Das legt nahe, dass die Oxysterole in Jurkat-Zellen die HMGCR auf einem anderen Wege, wie z.B. der Proteindegradation, regulieren.

Deswegen wurden aus den schon beschriebenen Versuchen Zelllysate per Western-Blot auf die Protein-Expression der HMGCR analysiert. HMGCR liegt als Tetramer (200 kDa) oder als Dimer (95 kDa) katalytischer Untereinheiten vor, die vermutlich in vielen Zellen durch schnelle Spaltung aus dem volllängen Protein (~ 100 kDa) hervorgehen (Istvan et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde die HMGCR im Western Blot nur als eine Bande bei 50 kDa

detektiert. Vermutlich hat der verwendete HMGCR-Antikörper speziell an ein Monomer (50 kDa) gegen katalytische Untereinheit gebunden.

Es wurde beobachtet, dass 22-HC die Proteinexpression der HMGCR unterdrückte bzw. die Degradation des Proteins begünstigte, auch wenn der Effekt wegen nur zweimaliger Wiederholung noch nicht signifikant war. Dadurch könnte die Inhibition von GPx4 durch 22-HC in Jurkat-Zellen verstanden sein. Gleichzeitig wurde die Expression der HMGCR durch ein weiteres Oxysterol (27-HC) leicht reguliert.

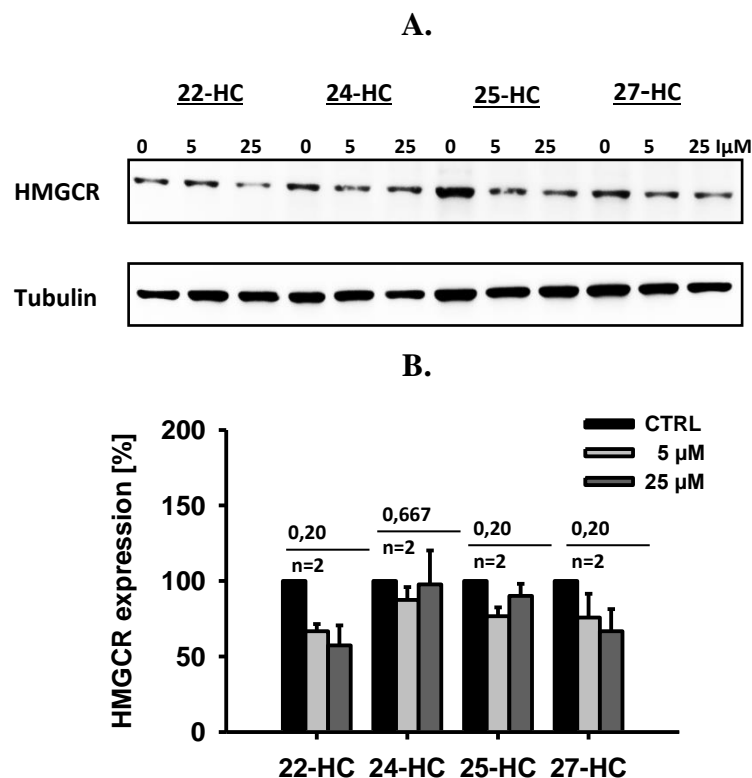


Abbildung 11. Einfluss der Oxysterole auf die HMGCR-Expression in Jurkat-Zellen

Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll kultiviert und mit vier Oxysterolen unterschiedlicher Konzentration behandelt. 15 µg des Probenlysates wurden in Western-Blots analysiert. Die statistische Auswertung stammt aus zwei Versuchen (n=2, One-Way, ANOVA).

4.4 Analyse der Selenoprotein-Expression in transgenen Mausmodellen der Hypercholesterolämie

Nachdem im zellulären System beobachtet wurde, dass Oxysterole die Selenoprotein-Biosynthese beeinflussen, wurde dem Effekt in einem *in vivo*-Modell nachgegangen. Dafür wurden zwei etablierte Arteriosklerose-Maus-Modelle, ApoE^{-/-} und LDLR^{-/-}-Knockouts, herangezogen. Als Kontrolltiere fungierten die entsprechenden C57BL6/J-Mäuse (Wildtyp, WT). Alle Tiere waren männlich und 20 Wochen alt.

Apolipoprotein E (ApoE) ist ein Glykoprotein der Größe von 34 kDa. Es wird überwiegend von Leber und Gehirn produziert und ist eine Strukturkomponente von allen Lipoproteinen ausgenommen dem LDL. Die Hauptaufgabe von ApoE ist in Chylomikronen- und VLDL-Remnants als Ligand für den ApoE-Rezeptor zu dienen. Dadurch werden viele Gewebe, die ApoE-Rezeptoren tragen, mit Fettsäure-reichen Lipoproteinen versorgt, z.B. Herz und Muskulatur. Weiterhin ist ApoE in die Immunregulation sowie in die Cholesterolaufnahme und biliäre Cholesterolausscheidung involviert. ApoE-tragende Lipoproteine können in ApoE-KO-Mäusen nicht aus dem Blut eliminiert werden. Dadurch steigt der Cholesterolspiegel im Blut signifikant und liegt mit 400-600 mg/dl deutlich über dem Wert von Kontrolltieren (75-110 mg/dl) (Veseli et al. 2017).

ApoE-KO-Mäuse sind gesund und unterscheiden sich nicht bezüglich des Gewichtes gegenüber den Wildtypen.

Das zweite Arteriosklerose-Modell, das in dieser Arbeit untersucht wurde, waren LDLR-/-Mäuse. Der LDL-Rezeptor ist ein Membran-Rezeptor mit einem molekularen Gewicht von 160 kDa, welcher die endozytotische Aufnahme der cholesterolreichen LDL-Partikel und somit ihren Spiegel in Plasma steuert.

Geht die Funktion von diesem Rezeptor verloren, steigt die Cholesterolkonzentration im Blut der Mäuse und liegt ungefähr bei 300 mg/dl. Die Mäuse zeigen somit einen geringeren Anstieg des Cholesterols als die ApoE-Knockout-Mäuse (Veseli et al. 2017).

4.4.1 Messung des Blut- und Leber-Cholesterols von ApoE- und LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen

Zunächst wurden die aktuellen Cholesterolwerte in Leber und Blut beider Mausmodelle ermittelt und mit den oben beschriebenen Literaturdaten verglichen (Veseli et al. 2017). Dafür wurden alle Proben mit einem aus dem verwendeten Kit (Kapitel 3.2) stammenden Detergenz-haltigen Puffer verdünnt, was bei der Berechnung der Cholesterolkonzentrationen später berücksichtigt wurde.

Die Cholesterolmessung zeigte eine signifikante Erhöhung des freien Cholesterols in den Lebern beider Tiermodelle. Beim Gesamtcholesterol in beiden Maustypen erreichten die Unterschiede keine Signifikanz. Dagegen lagen die Cholesterolblutwerte in ApoE- und LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen deutlich über den Werten von Kontrolltieren. Der Cholesterol-

spiegel von LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen war erwartungsgemäß unter dem Level von ApoE-KO-Mäusen (Veseli et al. 2017).

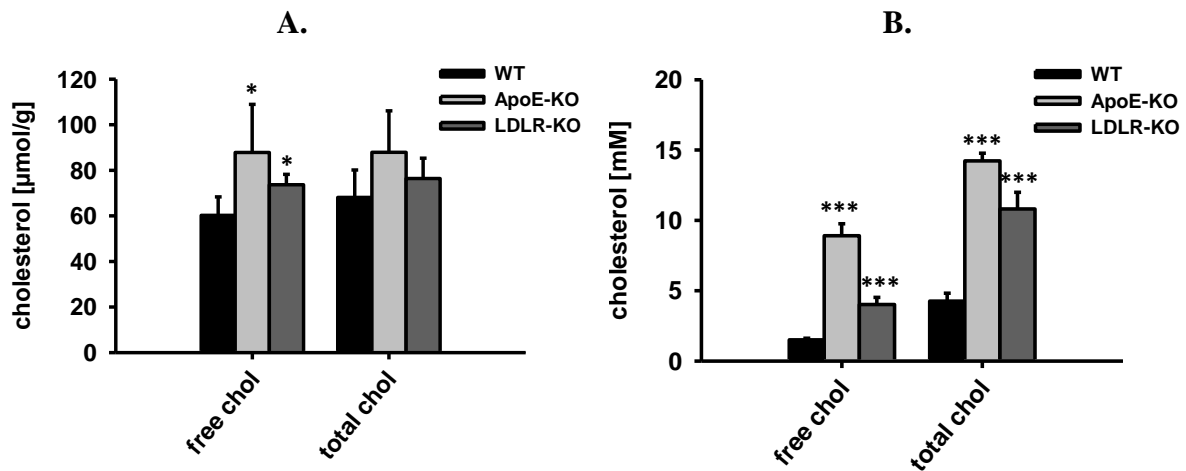


Abbildung 12. Cholesterolgehalt in Leber (A) und Blut (B) von ApoE- und LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen

Es wurde sowohl das freie Cholesterole (free chol) als auch Gesamtcholesterole (total chol) gemessen. Die Werte sind entweder in $\mu\text{mol/g}$ Protein (Leber) oder in mM (Blut) angegeben. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 unterschiedlichen Tieren ($n=5$) (* $p < 0,05$ versus WT; *** $p < 0,001$ versus WT; t-Test).

Als nächster Schritt stand die Frage im Vordergrund, ob die festgestellte Cholesterolsteigerung in den Lebern eine Auswirkung auf die Expression der Selenoproteine haben könnte. Dafür wurde eine Western-Blot-Analyse von Leber-Proben der transgenen Mäuse durchgeführt und mit den Kontrolltieren verglichen.

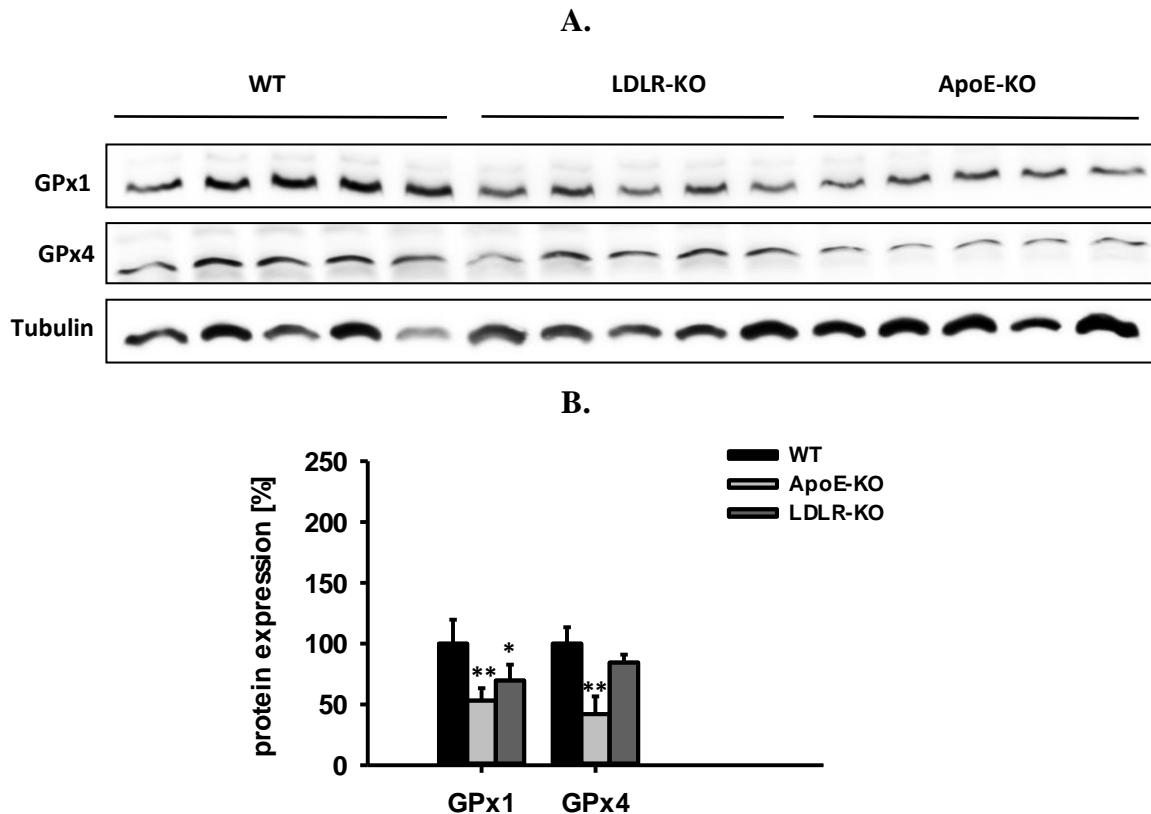


Abbildung 13. Western-Blot-Analyse (A) und densimetrische Auswertung (B) der Selenoproteine in den Lebern von Mäusen der Genotypen ApoE- und LDL-Rezeptor-Knockout, erste Präparation

Alle Mäuse sind 20 Wochen alt. Es wurden 15µg Gesamtprotein aufgetragen. (B) Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden von 5 (n=5) unterschiedlichen Tieren berechnet. Die Werte wurden auf ein Haushaltsgen Tubulin bezogen (*p < 0,05 versus WT; **p < 0,01 versus WT; t-Test).

Von den drei untersuchten Selenoproteinen war die Expression eines Enzyms der GPx1, in beiden Mauslinien signifikant herunterreguliert. Die GPx4-Expression war in ApoE-Mäusen ebenfalls signifikant verringert, hingegen blieb sie in LDLR-KO-Tieren unbeeinflusst. Die Expression von TrxR1 blieb auch hier völlig unverändert (Daten nicht gezeigt).

Wenn man die hierarchische Regulation der Selenoproteine in Betracht zieht, kam dieses Ergebnis nicht völlig unerwartet. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Expression von GPx4 generell höhere Priorität als GPx1 hat (Brigelius-Flohé 1999). Die Selenversorgung unterliegt auch einer hierarchischen Anordnung der Organe. Das heißt; dass unter einem Selenmangel die Synthese von einigen Selenoproteinen in bestimmten Organen reduziert wird, während ihre Synthese in anderen weiter betrieben wird. So schaffen es bestimmte Organe auch bei Selen-Mangel den Selen-Speicher aufrechtzuerhalten. Das Gehirn ist z.B. in der Selenversorgung bevorzugt, wobei Organe wie Leber und Niere, ihren Speicher schnell entleeren (Behne et al. 1988).

Die oben gezeigten Ergebnisse sollten in einer zweiten Leber-Präparation auf Reproduzierbarkeit überprüft werden (Abb. 14). Auch hier war eine moderate Verringerung der GPx1- und GPx4-Expression erkennbar. Zwischen beiden Präparationen lag ein deutliches Zeitintervall von mehreren Wochen.

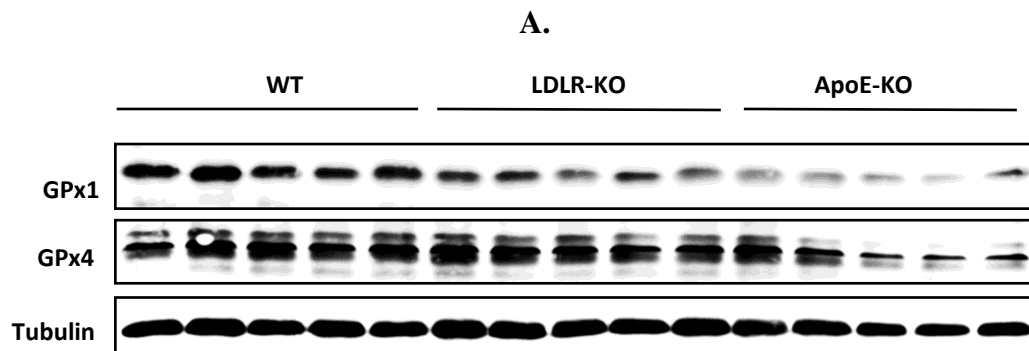


Abbildung 14. Western-Blot-Analyse der Selenoproteine in den Lebern von Mäusen der Genotypen ApoE- und LDL-Rezeptor-Knockout, zweite Präparation.

Alle Mäuse waren 20 Wochen alt. Es wurden 15 µg Gesamtprotein aufgetragen.

4.4.2 Untersuchung der Selenoprotein- und HMG-CoA-Reduktase-Expression auf transkriptioneller Ebene

Um die molekulare Ursache für die Unterdrückung der Gluthation-Reduktasen auch *in vivo* zu erarbeiten, wurde eine RT-PCR-Analyse der Leber-Proben durchgeführt.

Die Analyse der mRNAs in den Mausmodellen ergab keine signifikante Veränderung in den Spiegeln der Selenoproteine GPx1 und GPx4. Eine mittlere Transkriptionssteigerung von der TrxR1 in ApoE-KO-Mäusen hat zu hohe Variabilität erwiesen, sodass sie ebenfalls nicht signifikant war. Auch bei dem HMGCR-Gen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Kontrollmäusen; tendenziell ging die mRNA der HMGCR bei der LDL-Rezeptor-defizienten Mauslinie nach unten.

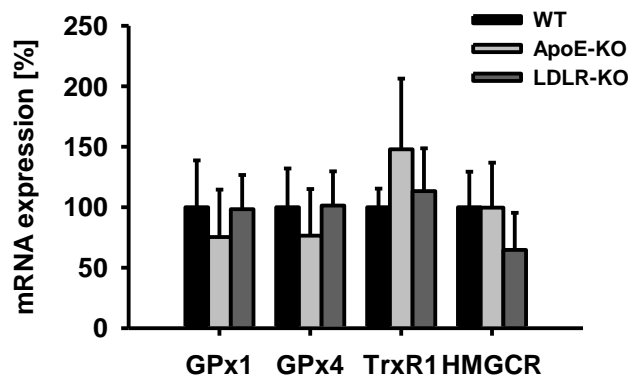


Abbildung 15. Analyse der mRNA-Spiegel der Selenoproteine in den Lebern von ApoE- und LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen.

Alle Leber-Proben wurden in einem Detergenzien-haltigen Puffer aufgenommen und es wurde mRNA isoliert, die Menge an RNA quantifiziert und die mRNA in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden alle Proben mittels RT-PCR analysiert. Als Referenzgen diente Tubulin. Alle Werte stammen von 5 Tieren (n=5).

Zusammengefasst hat die Untersuchung auch in den Lebern transgener Mäuse deutlich reduzierte GPx-Expression gezeigt, das Transkriptionsprofil dieser Gene blieb aber konstant. Damit erhärtet sich der Verdacht, dass die Regulation der GPx1 und GPx4 durch Cholesterin auf der post-transkriptionellen Ebene erfolgen könnte.

4.4.3 Analyse anderer Gewebearten

Da die Biosyntheserate und Funktion der Selenoproteine gewebespezifisch ist, wurden auch andere Gewebe außer der Leber untersucht. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse von Hoden und Nieren gezeigt.

In den Nieren wurde eine hohe Aktivität von Gluthationperoxidasen, besonders aber von GPx1 beschrieben (Brigelius-Flohé 1999; Behne et al. 1983). Bei einem Selenmangel wird GPx1 aber sehr schnell in den Nieren depletiert. Bei den adulten Mäusen verursacht GPx4-Knockout ein akutes Nierenversagen und ist somit letal (Friedmann et al. 2014).

Zunächst wurde eine Cholesterinbestimmung durchgeführt (Abb. 16). Die Messung zeigte keine Unterschiede bezüglich des Cholesterinhaltes in beiden Maus-Modellen gegenüber den Kontrollen. Diese Ergebnisse werden auch durch die Literatur bestätigt (Quarfordt et al. 1995; Osono et al. 1995).

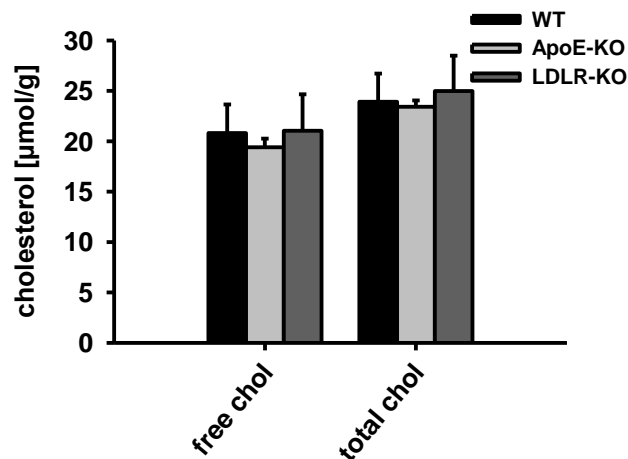


Abbildung 16. Cholesterolspiegel in der Niere in ApoE- und LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen

Es wurde sowohl das freie Cholesterol (free chol) als auch das Gesamtcholesterol (total chol) gemessen. Zur Analyse wurden jeweils 5 Tiere herangezogen (n=5).

Die GPx1-Expression zeigte Recht hohe Variabilität innerhalb der Gruppen (Abb. 17). Unter Berücksichtigung dieses Aspektes war keine Reduktion der GPx1-Spiegel zu sehen.

Die GPx4 zeigte sich im Western-Blot als ein schwaches Signal und konnte somit nicht quantifiziert werden.

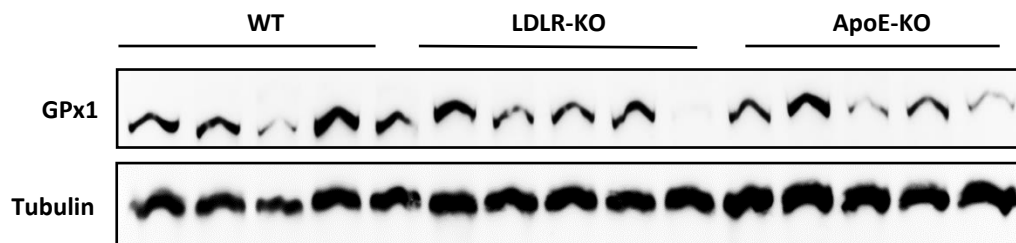


Abbildung 17. Analyse der GPx1 Expression in Nieren von ApoE- und LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen

Es wurden 15µg Gesamtprotein aufgetragen.

Ein weiteres zur Analyse ausgewähltes Gewebe war der Hoden. Im Hoden nimmt die GPx4 eine besondere Stellung in der Spermatogenese ein. Über einen ApoE-Rezeptor wird Selen in Form von Selenoprotein P effektiv in die Hoden aufgenommen und daraus GPx4 synthetisiert (Burk et al. 2009). Die Depletion des Selenoproteins GPx 4 verursacht die Unfruchtbarkeit von männlichen Mäusen (Brigelius-Flohe et al. 2009).

Die Cholesterolwerte in den Hoden der transgenen Mäuse und der Wildtypen waren identisch (Abb. 18).

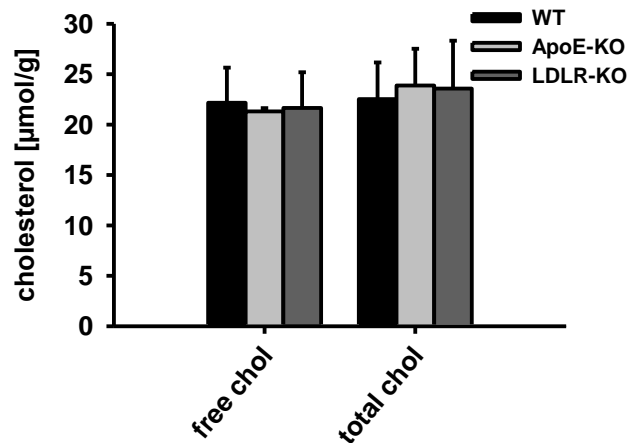


Abbildung 18. Die Cholesterolspiegel in den Hoden von ApoE- und LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen

Es wurde sowohl freies Cholesterol als auch das Gesamtcholesterol (Cholesterol + Cholesterolester) gemessen. Die Werte sind in $\mu\text{mol/g}$ Protein angegeben. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus 5 unterschiedlichen Tieren ($n=5$) berechnet.

Nachdem die Cholesterolkonzentrationen bestimmt worden waren, wurde die Expression der Selenoproteine analysiert. In den Hoden konnten alle drei Selenoproteine GPx1, GPx4 und TrxR1 detektiert werden. Die Analyse zeigte auch hier keine Variabilität in der Expression der untersuchten Selenoproteine, was mit dem unveränderten Cholesterolwerten korreliert.

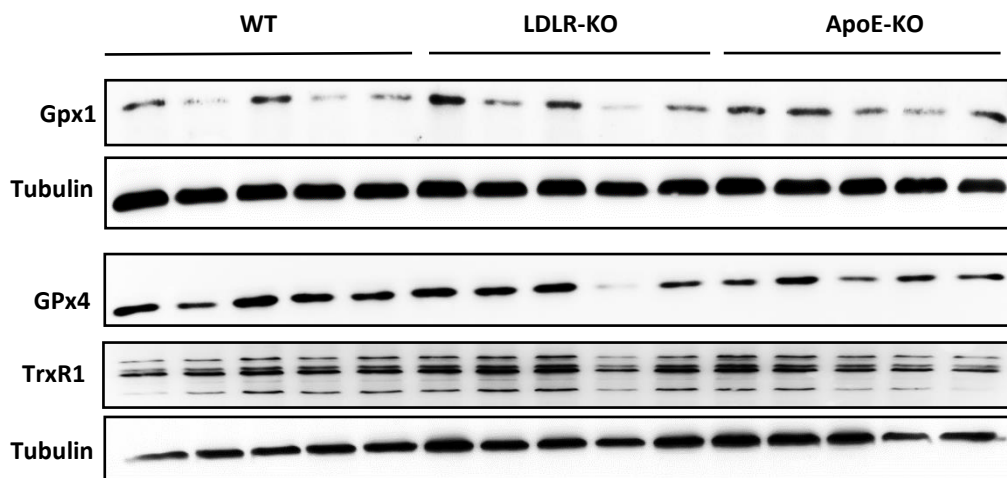


Abbildung 19. Western-Blot-Analyse der Selenoproteine in den Hoden von ApoE- und LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen

Es wurde 15 μg Gesamtprotein aufgetragen. Als Ladekontrolle diente Tubulin.

Neben diesen zwei Gewebearten wurden auch andere Gewebe wie Herz und Lunge untersucht (Daten nicht gezeigt). Dabei konnte kein Unterschied zwischen Wildtypen und Mutanten Mäusen gefunden werden, was wiederum mit dem unveränderten Cholesterolspiegel in jeweiligen Geweben korreliert.

Somit stand die Leber für weitere Untersuchungen im Fokus.

4.5 Untersuchungen in DIO-Mäusen, einem Modell für ernährungsbedingte Adipositas

Ein weiteres in dieser Arbeit untersuchtes Modell waren „Diet-induced obesity (DIO)“-Mäuse. Die Tiere wurden von Jackson Laboratory, Maine, USA bezogen. DIO-Mäuse wurden generiert, indem die männlichen Mäuse (C57BL/6J) ab einem bestimmten Alter (6 Wochen) mit einer speziellen Diät gefüttert wurden (siehe 2.3), 60 % der Kalorien stammten dabei aus Fett, die Kontrollgruppe erhielt eine angepasste Kontrolldiät (10 % der Kalorien aus Fett). Die Tiere wurden ursprünglich entwickelt, um die Fettleibigkeit und Diabetes zu erforschen (Surwit et al. 1988).

Tabelle 4. Körpergewichte der DIO-Mäuse nach 20 Wochen auf der entsprechenden Diät.

Maus-Nr.	Gewicht/g (DIO 10 %)	Maus-Nr.	Gewicht/g (DIO 60 %)
1	30,9	6	45,7
2	31,2	7	47,1
3	32,8	8	47,6
4	31,5	9	47,1
5	33,9	10	47,9

Alle Mäuse wurden gewogen (Tab. 2). Die fettreiche Ernährung hat eine deutliche Gewichtszunahme bewirkt, da die Gewichte von DIO (60 %)-Mäusen deutlich über den Gewichten der Kontrollgruppe lagen. Das Fell von DIO (60 %)-Mäusen war auch in der Tat fettig zusammengeklebt und glänzend. Die DIO (60 %)-Mäusen zeigten subjektiv eine geringere Aktivität.

Zunächst wurde untersucht, ob die fettreiche Ernährung eine Steigerung des Cholesterols in der Leber bewirkt haben könnte (Abb. 20).

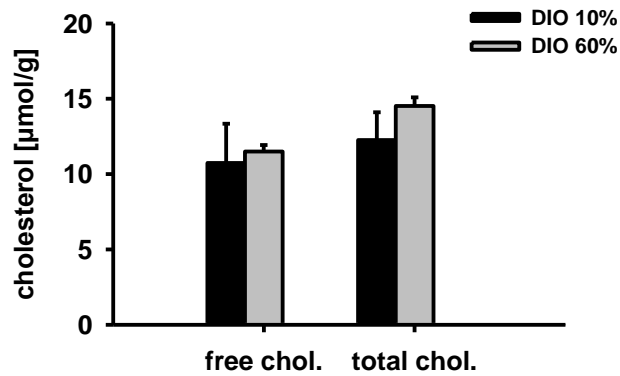


Abbildung 20. Cholesterolbestimmung in den Lebern von DIO-Mäusen

Es wurde sowohl freies Cholesterol als auch Gesamtcholesterols (Cholesterol + Cholesterolester) gemessen. Die Cholesterolkonzentration ist in $\mu\text{mol/g}$ Protein angegeben. Die Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von 5 Tieren ($n=5$).

Der Cholesterolgehalt in beiden Fütterungsgruppen war näherungsweise identisch.

Dennoch wurde auch hier das Expressionsmuster der Selenoproteine GPx1 und GPx4, die in den kultivierten Zellen und den Modellen der Arteriosklerose reguliert waren, untersucht. Im Gegensatz zu den transgenen Mäusen und behandelten Zellsystemen war keine Reduktion, sondern eine leichte Erhöhung der beiden Selenoproteine in DIO(60 %)-Mäusen, feststellbar. Nach aktuellem Wissenstand ist der Level an oxidativen Spezies in Fettgeweben erhöht. Gegebenenfalls konnte während einer Untersuchung von bestimmten Antioxidantien im Fettgewebe eine erhöhte Aktivität der GPx1 beobachtet werden (Wang et al. 2016). Andererseits wird eine erhöhte GPx1-Expression mit der metabolischen Erkrankung Diabetes mellitus in Verbindung gebracht (Zhou et al. 2013).

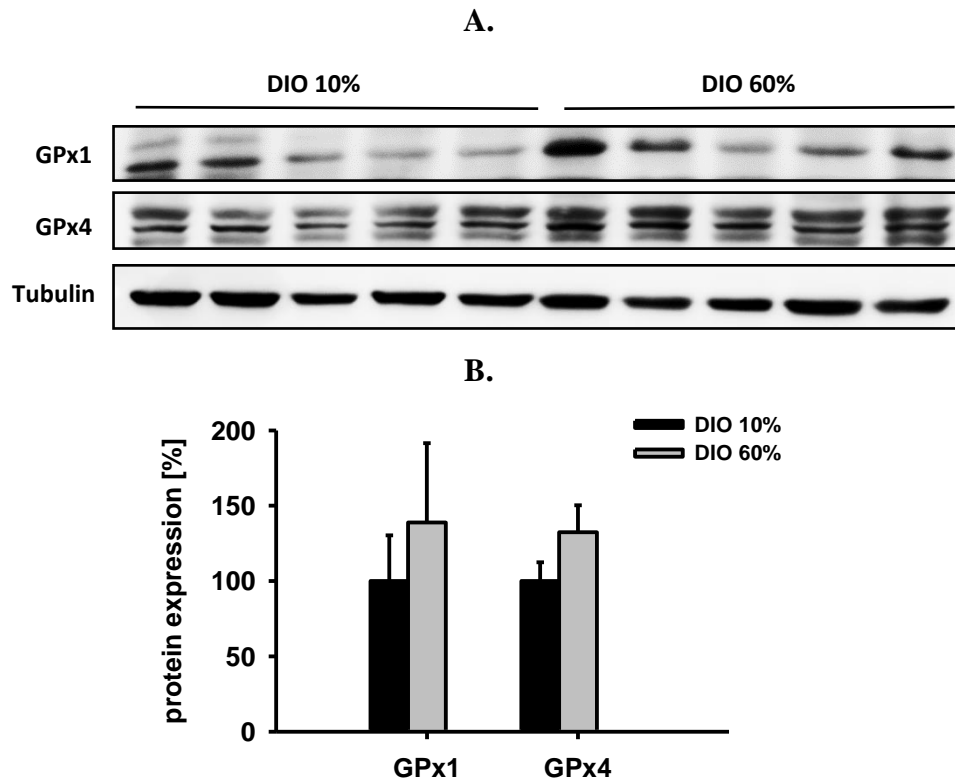


Abbildung 21. Expression von GPx1 und Gpx4 in den Lebern von DIO-Mäusen (A) und densitometrische Auswertung davon (B)

Die Tiere waren 20 Wochen alt. Es wurden insgesamt 15 µg Protein aufgetragen. Die Werte wurden auf Tubulin normiert. Alle Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus 5 Tieren ermittelt (n=5).

Neben den oben untersuchten Selenoproteinen wurden im DIO-Modell auch einige andere Selenoproteine bislang unbekannter Funktion untersucht, nämlich Sel.W und Sel.S.

Selenoprotein W ist das kleinste selenabhängige Protein, das überwiegend in Muskel und Gehirn, aber auch im Fettgewebe von der Leber exprimiert wird. Während der Spiegel von Selenoprotein W unter Selen-Mangel im Muskel niedrig ist, bleibt die Expression im Gehirn konstant (Raman et al. 2013). Es wird angenommen, dass das Selenoprotein W in die Redox-Regulation des 14-3-3-Proteins („signaling adapter protein“) involviert ist. Der Mechanismus dieser Regulation ist noch unverstanden, genauso wie die physiologische Aufgabe von Selenoprotein W (Labunsky et al. 2014).

Ein weiteres noch wenig erforschtes Protein ist Selenoprotein S. Selenoprotein S ist ein Transmembranprotein und im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Selenoprotein S wird überwiegend in Leber, Fettzellen und Muskelzellen exprimiert. Wie den meisten Selenoproteinen werden ihm antioxidative Eigenschaften zugeschrieben sowie die Funktion mutmaßlicher Integration der Rückfaltung fehlgefalteter Proteine (Huang et al. 2010). In der Literatur

sind Studien zu finden, die beschreiben, dass Selenoprotein S in der Pathogenese und Progression von Diabetes mellitus und Arteriosklerose eine Rolle spielen könnte (Yu et al. 2016).

Bei der Western-Blot-Analyse der beiden Selenoproteine in DIO-Mäusen fiel ein gegenläufiges Expressionsmuster von Selenoprotein S und Selenoprotein W auf. Die Expression von Selenoprotein S in DIO (60 %)-Mäusen war deutlich erhöht, dagegen war der Spiegel von Selenoprotein W reduziert (Abb. 22). Das Ergebnis von Selenoprotein S in DIO (60 %)-Mäusen spiegelt möglicherweise Literaturdaten wider, die eine Korrelation zwischen einem erhöhten Plasmaspiegel von Selenoprotein S und der Progression des Diabetes mellitus zeigen (Yu et al. 2016).

Ein deutlich anderes Expressionsprofil von Selenoproteinen S zeigte sich in den zuvor untersuchten Modellen der Hypercholesterolämie (Abb. 22). Der Selenoprotein S-Gehalt war sowohl in ApoE-KO-Mäusen als auch in LDLR-KO-Mäusen signifikant reduziert; eine signifikante Abnahme von Selenoprotein W war in LDLR-KO-Mäusen zu beobachten.

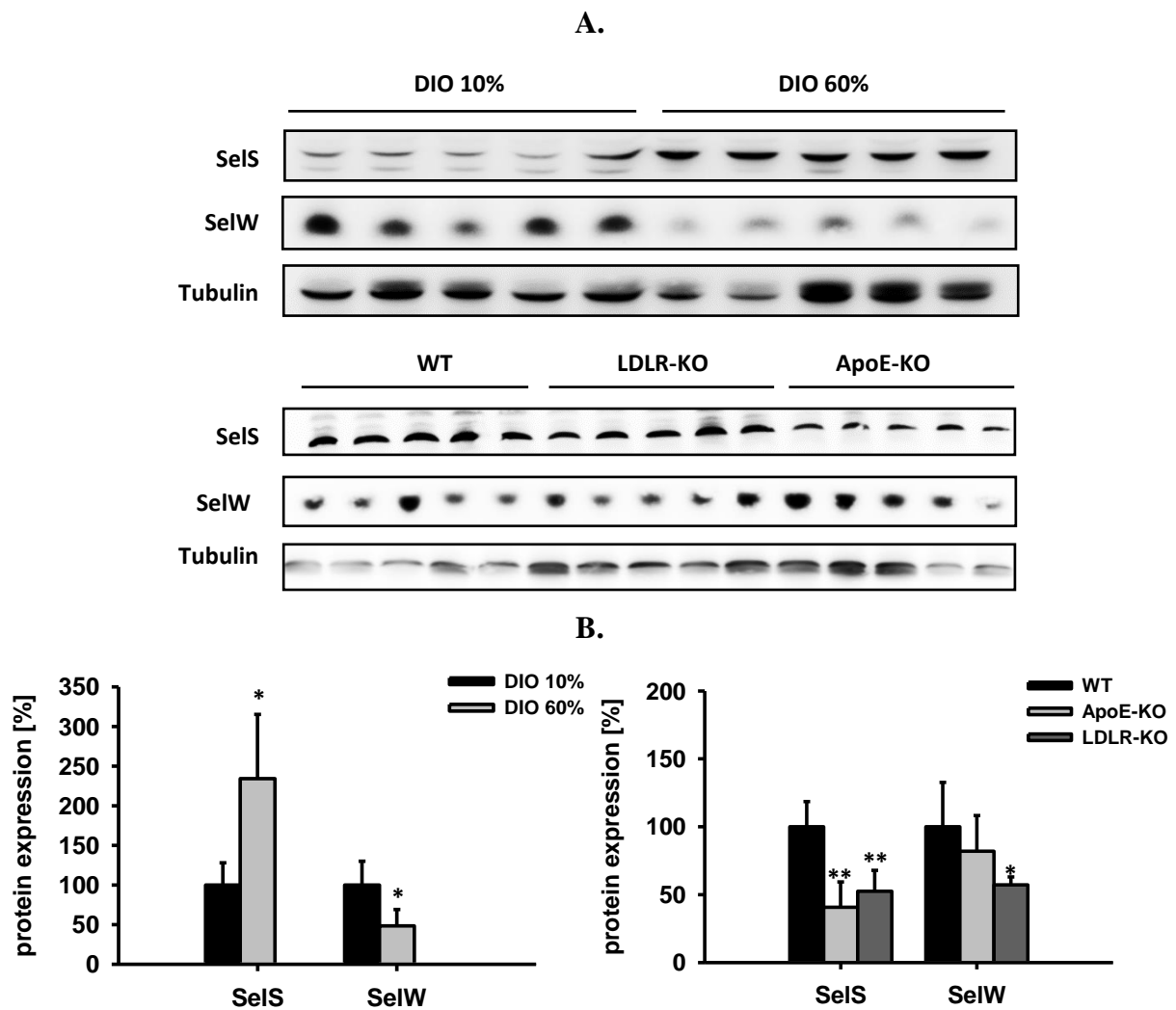


Abbildung 22. Vergleich der Expression von SelS und SelW in DIO- und transgenen Mäusen.

Dargestellt sind Western-Blot-Analysen (A) von SelS und SelW in unterschiedlichen Tiermodellen und ihre densitometrische Auswertung (B). Es wurden 15 µg Protein aufgetragen. Alle Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von 5 Tieren (* $p < 0,05$ versus DIO 10 %, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ versus WT; t-Test).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Selenoprotein S in den Lebern der verschiedenen Tiermodelle unterschiedlich reguliert wird. In hyperlipidemischen aber isocholesterolemischen DIO-Mäusen wurde eine Steigerung eventuell durch den Anstieg des oxidativen Stresses ausgelöst, wohingegen seine Suppression in hypercholesterolemischen ApoE- und LDLR-KO-Mäusen posttranslational eine Unterdrückung der Selenoprotein-Synthese zustande kam. Die Effekte des Cholesterols auf die Selenoprotein-Expression in ApoE- und LDLR-KO-Mäusen waren also durchaus spezifisch: GPx1 und GPx4 sowie Sel W und SelS waren verringert, und TrxR1 war unverändert. In non-spezifischen hyperlipidemischen DIO (60 %)-Mäusen war hingegen nur SelW verringert, während GPx1 und GPx4 unverändert waren; SelS war induziert. Solche Proteine reagieren also höchst differenziell auf Voraussetzungen im Lipidstoffwechsel der Leber.

5 Diskussion

5.1 Unterschiedliche Mechanismen der Beeinflussung der Selenoprotein-Synthese durch Oxysterole in Hepatozyten und T-Lymphozyten

Diese Arbeit beschreibt den Mechanismus der endogenen Inhibition der Selenoprotein-Expression durch Cholesterol und einige seiner Derivate (Abb. 23).

Eine klinisch relevante und funktionelle Verbindung zwischen der Cholesterolsynthese und der Selenoprotein-Biosynthese wurde erstmals in Arbeiten von Moosmann und Behl (2004a; b) postuliert. Demnach sollten die Nebenwirkungen der Statine, insbesondere deren häufige muskuläre Nebenwirkungen, die bei etwa 10 % der behandelten Patienten auftreten, auf eine Hemmung der Selenoprotein-Synthese zurückzuführen sein. Statine sind kompetitive Hemmer der HMG-CoA-Reduktase und werden bei einer Hypercholesterolämie als ein Mittel der ersten Wahl eingesetzt. Biochemisch könnte es bei einer Statinbehandlung nach Moosmann und Behl (2004a; b) prinzipiell auch zu einem Mangel an Isopentenylpyrophosphat und nachgeschaltet zu einer insuffizienten Sec-tRNA-Isopentenylierung kommen.

Die initiale Hypothese der Selenoprotein-Suppression durch Statine sowie einer funktionellen Störung des antioxidativen Systems wurde nachfolgend in Zellkultur für Muskelzellen und Leberzellen bestätigt (Kromer et al. 2009; Fuhrmeister et al. 2012). Die mRNA-Transkription der auf Proteinebene veränderten Selenoproteine hatte sich jedoch nicht verändert, was auf einen posttranslationalen Mechanismus hinwies, wie beispielsweise eine defekte Sec-tRNA-Reifung (Kromer et al. 2009; Fuhrmeister et al. 2012).

Nun sind Statine synthetische pharmazeutische Moleküle, die von außen in einen endogen komplex regulierten Syntheseweg eingreifen. Es stellte sich somit die Frage, ob endogene negative Regulatoren des Mevalonatwegs möglicherweise ebenfalls auf die Expression der Selenoproteine auswirken könnten. Interessanterweise ist Cholesterol, das Endprodukt des kanonischen Mevalonatwegs, der wohl stärkste bekannte und multimodale Inhibitor dieses Stoffwechselweges, und zwar primär an derselben Stelle, der HMG-CoA-Reduktase, an welcher auch die Statine angreifen (Abb. 26). Aus dieser Beobachtung ergab sich die testbare und bislang nicht untersuchte Frage, welche Auswirkungen Cholesterol und Oxysterole auf den Selenoprotein-Haushalt haben.

Diese Kernfrage der vorliegenden Arbeit wurde zunächst anhand von Zellkulturexperimenten in klonalen humanen Hepatozyten und Lymphozyten untersucht, die als Repräsentanten für

Zellen mit hohem und niedrigem Flux durch den Mevalonatweg gewählt wurden (Wang et al. 1988; Gutiérrez-García et al. 2013). Die Behandlung der Hepatozyten mit vier Hydroxysterolen (HC), nämlich 22-HC, 24-HC, 25-HC und 27-HC zeigte wesentliche Unterschiede in Bezug auf die Selenoprotein-Expression.

Zwei Oxysterole, nämlich 22-HC und 25-HC (Abb. 6) zeigten einen signifikanten Effekt in HepG2-Zellen. 22-HC war in der Lage, den GPx1-Spiegel leicht zu reduzieren (Signifikanz in t-Test bei 25µM), wohingegen 25-HC die GPx4-Expression deutlich reduzierte (Signifikanz in t-Test und in ANOVA). Ein möglicherweise ähnlicher Effekt trat bei der GPx4 auch mit anderen Hydroxysterolen auf, eine statistische Signifikanz in ANOVA wurde jedoch aufgrund größerer Datenvariabilität nicht erreicht (Abb. 6). Experimente mit 25-HC unter absolut cholesterolfreien Bedingungen (mit Opti-MEM-Medium ohne Serum) (Abb. 8) bestätigten den beobachteten Effekt auf der Selenoprotein-Ebene und zeigten eine möglicherweise noch etwas deutlichere Reduktion der GPx4 durch 25-HC als unter Niedrig-Serum-Bedingungen mit 1 % fötalem Kälberserum. Dies lässt vermuten, dass die Auswirkungen der Hydroxysterole auf die Biosynthese der Selenoproteine in den vorherigen Versuchen durch das im Serum vorhandene Rest-Cholesterol abgeschwächt gewesen sein könnten.

Die TrxR1 (Abb. 6) blieb bei Behandlung mit allen vier Hydroxysterolen weitgehend konstant. Dies entspricht der in der Literatur häufig zu findenden Beobachtung, dass das TrxR1-Gen ein sehr stabil exprimiertes, essentielles Gen darstellt, das beispielsweise auch bei chronischem Selenmangel bis zuletzt auf einem niedrigen, aber konstanten Niveau transkribiert und translatiert wird (Behne et al. 1988; Brigelius-Flohe 1999). Diese Konstanz könnte daher rühren, dass die Translation der TrxR1 vermutlich unabhängig von der Isopentenylierung der Sec-tRNA ist (s. Abschnitt 1.2). Die Isopentenylierung der Sec-tRNA an Adenosin 37 scheint eine zentrale Rolle als intermediärer Regulationsschritt in der Regulation der Selenoprotein-Synthese nur bestimmter Selenoproteine in Abhängigkeit vom Vorhandensein von genügend Selen zu spielen wie folgt.

Die entscheidende und hierarchisch letzte tRNA-Modifikation, die auf den Selenspiegel in der Zelle reagiert und im Wesentlichen nur dann abläuft, wenn relativ viel Selen zur Verfügung steht, ist eine Methylierung der Sec-tRNA an Uridin 34 (Carlson et al. 2005). Dadurch kommt es dann vermittelt durch die tRNA zu einer effizienten Translation der „stressabhängigen“ und induzierbaren, jedoch kurzfristig nicht lebensnotwendigen Selenoproteine wie GPx1. Eine fehlende Methylierung der Sec-tRNA unter Selenmangelbedingungen hat aber wenig oder keinen Einfluss auf die Translation der sogenannten Selen-„Haushaltsproteine“ wie TrxR1

und TrxR3, die für die Zelle immer unabdingbar sind und deswegen auch unter relativen Selenmangelbedingungen weiterhin synthetisiert werden müssen, wobei das notwendige Selen mutmaßlich aus dem Abbau anderer, weniger wichtiger Selenoproteine und aus anderen Geweben stammt. Diese Hierarchie der Selenversorgung ist seit Langem bekannt, wobei insbesondere das Gehirn ein privilegiertes Organ darstellt, die Leber jedoch ein unprivilegiertes Organ (Behne et al. 1988).

Interessanterweise hängt nun die besagte funktionelle Methylierung quantitativ von einer möglichen vorherigen Isopentenylierung der Sec-tRNA an Adenosin 37 ab. Eine mutmaßliche Funktion der Sec-tRNA-Isopentenylierung besteht somit darin, dass sie die Schalterfunktion der nachfolgenden Methylierung, die den zellulären Selenstatus „erfüllt“, strukturell erst ermöglicht (Moustafa et al. 2001). Eine fehlende Isopentenylierung würde demnach verhindern, dass die Zelle adäquat auf schwankende Selenversorgung reagiert und möglicherweise immer nur stabil die essentiellen Selen-Haushaltsproteine herstellt, jedoch die Fähigkeit zur Selenoprotein-Induktion auf Stress hin verloren hat. Diese Interpretation ist bislang nicht allgemein akzeptiert, stellt aber eine der häufigeren Nullhypothesen dar.

Um den Mechanismus der scheinbaren Unterdrückung der GPx1 und GPx4 in HepG2-Zellen weiter zu untersuchen, wurde eine RT-PCR-Analyse von mit Oxysterolen behandelten Zellen durchgeführt (Abb. 7). Die mRNA-Konzentrationen von allen Selenoproteinen blieben entweder konstant oder waren wie im Fall der GPx4 sogar etwas erhöht. Trotz einer verringerten Proteinexpression der stressinduzierten Selenoproteine durch beide Oxysterole (22-HC und 25-HC) wurde die Transkription aller in dieser Arbeit untersuchten Selenoproteine jedoch weder durch 25-HC noch durch 22-HC negativ reguliert (Abb. 7). Daraus kann geschlossen werden, dass die Wirkung der beiden Oxysterole auf einer post-transkriptionellen Ebene erfolgte. Ein plausibler Mechanismus für eine solche post-transkriptionelle Regulation wäre eine insuffiziente Modifikation der Sec-tRNA durch eine verminderte Synthese des notwendigen Zwischenprodukts Isopentenylpyrophosphat. Sollte dieser Mechanismus entscheidend sein, müsste es unter Hydroxysterolen zu einer Verminderung der Isopentenylpyrophosphat-Synthese kommen, was sich im einfachsten Falle auf eine Verringerung der HMGCR-Aktivität zurückführen ließe. In der Tat wurde bei Behandlung mit 25-HC eine stark unterdrückte HMGCR-Transkription beobachtet (Abb. 7B). Dies entspricht dem klassischen Weg der Regulation der Cholesterolsynthese durch negative Rückkopplung, die bekanntermaßen auch den Flux durch den Mevalonatweg hemmt (Brown und Goldstein 2009) (Abb. 23).

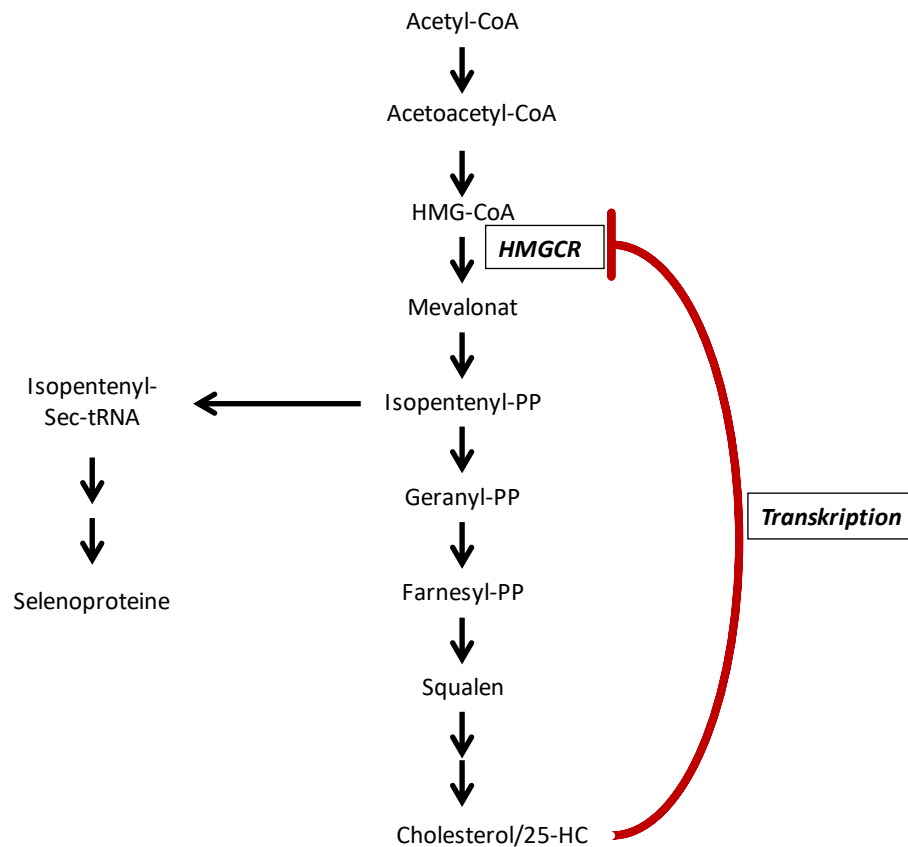


Abbildung 23. Klassische negative Rückkopplung der Cholesterolsynthese durch 25-Hydroxycholesterol

Unter Behandlung mit 22-HC blieb die Transkription der HMGCR in Hepatozyten jedoch unverändert, was überraschend ist, da auch unter 22-HC ein Effekt auf die Selenoprotein-Expression beobachtet wurde. Hier kämen dann nur andere, weniger gut etablierte Mechanismen der Mevalonatweg-Regulation in Frage, wie beispielsweise eine verringerte Translation der HMGCR sowie möglicherweise auch ein stimulierter Abbau der HMGCR durch das Proteasom (Espenshade and Hughes 2007) (Abb. 24). Ein direkter Nachweis der HMGCR-Proteinexpression in Hepatozyten durch einen Western-Blot gelang im Rahmen dieser Arbeit leider nicht, da verschiedene kommerzielle Antiseren keine spezifischen Banden mit HepG2-Zellen lieferten. In Jurkat-Zellen gelang dieser Nachweis jedoch und zeigte in der Tat eine Beeinflussung der HMGCR-Proteinexpression (Abb. 11), wie weiter unten diskutiert wird.

Die Inkubation mit zwei weiteren Oxysterolen, nämlich 24-HC und 27-HC, zeigte im Gegensatz zu 22-HC und 25-HC keinen Effekt auf die Expression von Selenoproteinen in Hepatozyten (Abb. 6). Diese Beobachtungen ergeben möglicherweise einen Sinn, wenn man den Syntheseort und die physiologische Bedeutung der einzelnen Oxysterole berücksichtigt. Das 24-Hydroxycholesterol wird vorwiegend durch das Enzym CYP46A1 im Gehirn gebildet und kann im Gegensatz zu Cholesterol über die Blut-Hirn-Schranke in die Peripherie gelangen.

Dadurch spielt es eine wichtige Rolle im Efflux von Cholesterol aus diesem Organ, es scheint jedoch kein negativer Rückkoppler für den Mevalonatweg zu sein. Letzteres gilt mutmaßlich auch für das 27-Hydroxycholesterol, das in der Leber und anderen Geweben durch die Cholesterol-27-Hydroxylase (CYP27A1) gebildet wird. Es spielt vermutlich eine Rolle in der Homöostase des Cholesterolgehaltes von peripheren Geweben (Dzeletovic et al. 1995), aber auch als selektiver Estrogenrezeptor-Modulator.

Die Substanz 22-Hydroxycholesterol wurde bis heute noch am wenigsten untersucht. Wie bereits im Abschnitt 1.2 erläutert ist 22-Hydroxycholesterol als Ligand mit hoher Affinität zu den nukleären Rezeptoren Leber-X-Rezeptor- α (LXR α) und Leber-X-Rezeptor- β (LXR β) in der Literatur beschrieben (Vaya et al. 2007; Boyd et. al. 2001). Die Auswirkung von 22-HC auf die GPx1 in Hepatozyten könnte, außer durch einen induzierten Abbau der HMGCR auch durch die Bindung an einen nukleären LXR-Rezeptor zurückzuführen sein. Durch LXR-Aktivierung werden sehr viele Gene, die in die Cholesterolsynthese und den Cholesterol-Transport involviert sind, kontrolliert. Unter anderem werden relativ späte Enzyme im Cholesterolsyntheseweg gehemmt und der Cholesterol-Efflux gefördert, was diverse Sekundäreffekte auf die Bereitstellung von IPP für die Selenoprotein-Synthese haben könnte. Ein direkter Weg, der die hier gemachten Beobachtungen erklären würde, lässt sich jedoch aktuell nicht nachzeichnen.

Im Gegensatz dazu steht 25-Hydroxycholesterol, das in seiner Funktion als negativer transkriptioneller Hauptregulator der Cholesterolbiosynthese in der Leber bekannt ist. Dies ließ sich in HepG2-Zellen auch in der vorliegenden Arbeit (Abb. 6, Abb. 7, Abb. 8) bestätigen.

Ein nicht völlig unähnliches Bild wie in HepG2-Zellen zeigte sich in den untersuchten Jurkat-T-Zellen. Auch hier waren 22-HC und 25-HC die stärksten Suppressoren der GPx4-Expression, wobei jedoch die GPx1 in relativ unspezifischer Weise durch alle vier Oxysterole verringert wurde (Abb. 9). Die TrxR1-Expression blieb in den T-Zellen wiederum unverändert, was eine Rekapitulation des Ergebnisses in Hepatozyten bedeutet. Diese Unterschiede unterstreichen zunächst eine zellspezifische Regulation der Selenoproteine (Kapitel 1.2). Wenn einige Zellen empfindlicher auf Selenschwankungen reagieren als andere (Brigelius-Flohe 1999; Behne et. al. 1998), so ist es prinzipiell auch nicht verwunderlich, dass jene Zellen auch anders auf mögliche endogene Regulatoren der Selenoprotein-Synthese reagieren. Interessant ist jedoch die Tatsache, dass es trotz der für das Zellüberleben hier unvermeidlichen hohen Serum-Mengen von 10 % im Medium überhaupt einen Effekt der Oxysterole auf die Selenoprotein-Expression gab. Die damit verbundene höhere Konzentration an LDL-

Partikeln scheint jedoch den Effekt der Oxysterole zumindest nicht annulliert zu haben. Jurkat-Zellen exprimieren auch in der Tat LDL-Rezeptoren (Makar et al. 1994), jedoch vermutlich in geringerer Menge als Hepatozyten. Ferner werden diese stark reguliert (Makar et al. 1994), sodass es möglich erscheint, dass in Jurkat-Zellen entweder nicht genügend freies Cholesterin vorhanden war, um einen Effekt der Oxysterole zu maskieren, oder dass der Effekt der Oxysterole sogar über eine Beeinflussung des Cholesterin-Imports aus dem Medium vermittelt wurde. Auch wenn es keine physiologisch relevanten Messungen hierzu gibt, so ist es plausibel anzunehmen, dass das Gros des Cholesterins in T-Zellen nicht aus der Eigensynthese stammt, sondern in der Tat durch Import aus dem Plasma aufgenommen wird (Bietz et al. 2017). Die mögliche Bedeutung solcher nicht-kanonischer Mechanismen (Abb. 24) wird durch die durchgeführten PCRs unterstrichen. Im Gegensatz zu den HepG2-Zellen folgte nämlich keines der Oxysterole 22-HC und 25-HC in den Lymphozyten dem klassischen Rückkoppelungsmechanismus (Kapitel 1.1.3) und unterdrückte die Transkription der HMGCR.

Ein solcher nicht-kanonischer Mechanismus wäre die Induktion des Ubiquitin-vermittelten Abbaus der HMGCR, beispielsweise durch die Bindung von HMGCR an Insig (Kapitel 1.1.2), was einen Ubiquitin-vermittelten Abbau der HMGCR zur Folge hat (Espenshade und Hughes 2007; Gil et al. 1985). Die Analyse des Proteinlevels der HMGCR zeigte (Abb. 11), dass durch 22-HC die Proteinexpression der HMGCR tatsächlich beeinflusst wurde, was obigen Mechanismus stützen würde (Abb. 24). In der Folge würde durch die verminderte HMGCR-Aktivität via geschwächtem Mevalonatweg die Synthese der GPx4 reduziert.

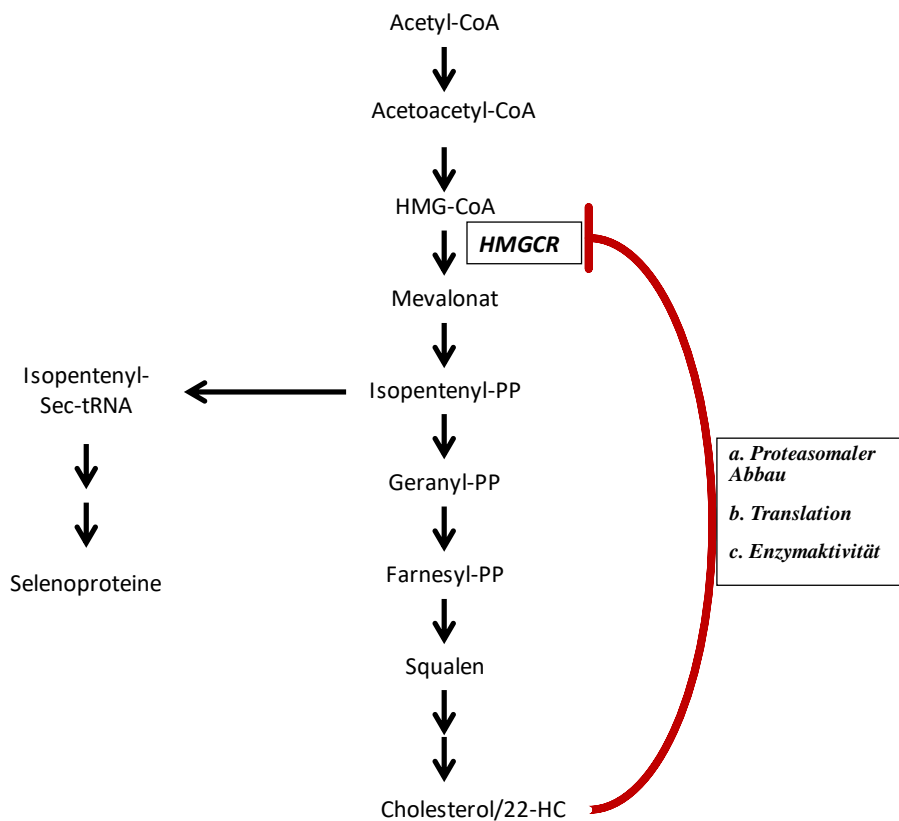


Abbildung 24. Denkbare Regulationsmechanismen der Cholesterolsynthese durch 22-Hydroxycholesterol

In Lymphozyten konnte der klassische Mechanismus der transkriptionellen Regulation der HMGCR durch die Behandlung mit 22-Hydroxycholesterol nicht bestätigt werden. Weitere, bekannte Mechanismen sind hier gezeigt.

Selenoproteine sind essentiell für die Funktion und Proliferation von T-Lymphozyten und spielen somit in der Immunabwehr eine wichtige Rolle (Rayman 2009). Andererseits konnten mehrere Studien einen statistischen Zusammenhang zwischen niedrigem Cholesterolspiegel und Infektionskrankheiten oder Tumorerkrankungen nachweisen (Fraunberger et al. 1999; Chiarla et al. 2004). Weitere Studien beschreiben die Bedeutung von 25-HC in der Regulation der Funktion des adaptiven Immunsystems. Beispielsweise kann 25-HC durch Makrophagen gebildet werden und die Produktion von Immunoglobulin A in B-Zellen supprimieren (Bauman et al. 2009). Aus der Tatsache, dass Cholesterol mit verschiedenen Krankheitsbildern assoziiert ist, die starken immunologischen Einflüssen unterliegen, und der zumindest in Ansätzen bekannten Rolle der Selenoproteine für die Immunabwehr ergibt sich die interessante Möglichkeit, dass die immunologischen Effekte des Cholesterols über eine Modulation der Selenoproteine hervorgerufen werden. Die Tatsache, dass dieser Zusammenhang nicht schon in der Vergangenheit erkannt wurde, ließe sich plausibel damit erklären, dass er im Wesentlichen auf einem nicht-transkriptionellen Mechanismus fußt und somit in modernen, massiv-parallelen Analysen wie dem RNA-Sequencing nicht gefunden werden würde.

5.2 Spezifisch veränderte Selenoprotein-Expression in der Leber in Mausmodellen der Hypercholesterolämie

Um mögliche Veränderungen der Selenoprotein-Expression auf ein verändertes Cholesterol *in vivo* zu untersuchen, wurden zwei etablierte Mausmodelle der Hypercholesterolämie herangezogen (Breslow 1996). Diese auf Black/6-Mäusen basierenden Mausmodelle, ApoE-Knockout-Mäuse (ApoE-KO) und LDL-Rezeptor-Knockout-Mäuse (LDLR-KO) weisen bei normaler Fütterung in adulten Tieren erhöhte Cholesterolspiegel im Plasma auf (Breslow 1996; Vesli et al. 2016). Unter einer cholesterolreichen Diät entwickeln diese Mäuse im Laufe ihres Lebens arteriosklerotische Plaques (Ishibashi et al. 1993; 1994). Das LDLR-KO-Modell entspricht genetisch dem Krankheitsbild der familiären Hyperlipoproteinämie Typ II, die durch einen Defekt in LDLR-Gen hervorgerufen werden kann oder auch durch einen Defekt in einem Liganden dieses Rezeptors. Dadurch kann Cholesterol aus dem Plasma nicht aufgenommen werden, was zur intrazellulären Steigerung der Cholesterolsynthese führt. Es kommt zu einer eher milden Akkumulation von Cholesterol in der Leber und zu einem sehr ausgeprägten Anstieg des Plasma-Cholesterols, welcher auch in den untersuchten Mäusen wiedergefunden wurde (Abb. 12). Alle verwendeten Tiere waren männlich, 20 Wochen alt und wurden auf normalem Futter gehalten.

In der Leber dieser Tiere wurde eine Veränderung der Selenoprotein-Expression festgestellt (Abb. 13), wobei wiederum die Gpx1 und die Gpx4 von einer verringerten Expression betroffen waren. Die verminderte Expression der beiden Glutathionperoxidasen in der Leber ließe sich anhand der parallelen Cholesterol-Messungen in der Leber erklären, da sowohl ApoE-KO- als auch LDLR-KO-Mäuse statistisch signifikant erhöhte Konzentrationen an freiem Gewebs-Cholesterol aufwiesen (Abb. 12).

Die Transkriptionsanalyse der Selenoproteine in den untersuchten Tiermodellen ergab wie in den Zellkultur-Experimenten keinerlei Unterschiede bezüglich der mRNA-Konzentrationen der Selenoproteine gegenüber den Kontrollen (Abb. 15). Die HMGCR-Transkription war jedoch ebenfalls nicht oder nur minimal (LDLR-KO) beeinflusst (Abb. 15). Dies erscheint einerseits in Anbetracht der nur geringen Cholesterol-Erhöhungen in der Leber nicht völlig unplausibel, andererseits würde dadurch das bereits oben diskutierte kanonische Modell einer geringeren IPP-Synthese aufgrund einer geringeren HMGCR-Transkription wegfallen. Andererseits findet die Regulation der HMGCR sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationaler Ebene statt. Ferner scheint der proteolytische Abbau der HMGCR Ziel einer Regulation zu sein (Goldstein und Brown 1990; Espenshade und Hughes 2007), genauso wie die

Enzymaktivität der HMGCR, die über Phosphorylierung (inaktive Form) und Desphosphorylierung (aktive Form) reguliert wird (Burg et al. 2011). Die Untersuchung der HMGCR-Translation oder ihres Abbaus ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit leider nicht gelungen, da überraschenderweise kein kommerzielles Antiserum zur verlässlichen Detektion dieses Enzyms in der Mausleber in der Lage war.

Als ein letzter denkbarer Mechanismus, der zu einer verringerten Expression von Selenoproteinen führen konnte, sei die möglicherweise durch Cholesterol vermittelte Regulation der tRNA-Isopentenyltransferase Trit1 genannt (Fradejas et al. 2013) (Abb. 25). Die Expression von Trit1 erfolgt substratabhängig und könnte wie die Expression anderer Prenyltransferasen durch Cholesterol negativ reguliert sein. Aktuelle, unpublizierte Daten aus cholesterolgefütterten Kaninchen, die in der Arbeitsgruppe der Promovendin erhoben wurden, haben in der Tat eine Verringerung der Trit1-Proteinexpression um mehr als 90 % gezeigt (Schulze et al. unpubliziert). Auch in diesen Tieren war die HMGCR-mRNA trotz stark erhöhter Gewebs-Cholesterolspiegel unverändert geblieben, in Übereinstimmung mit der Literatur (Xu et al. 1995). Entsprechenden Untersuchungen in Mäusen sollten angestellt werden.

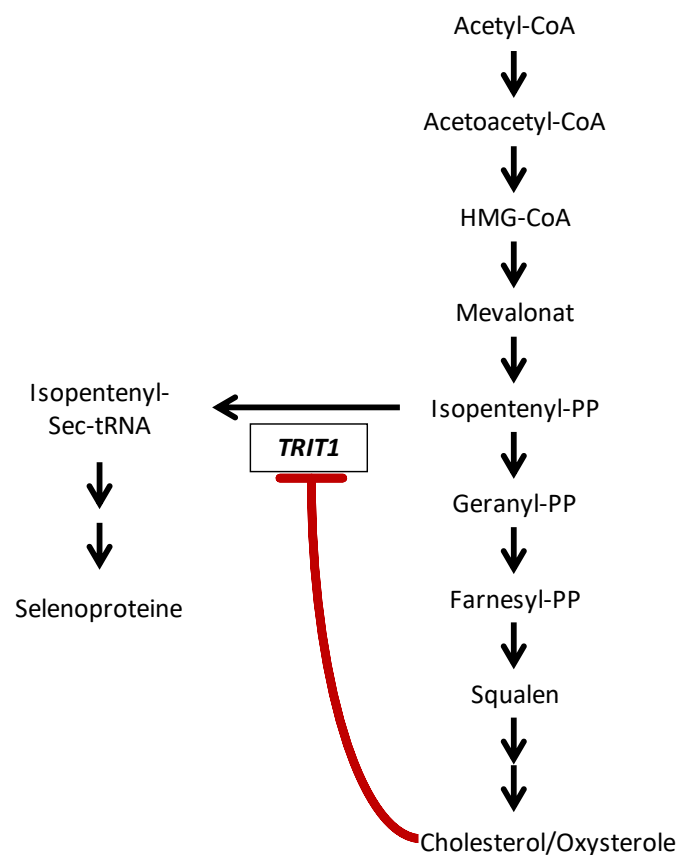


Abbildung 25. Cholesterol vermittelte Regulation der tRNA-Isopentenyltransferase Trit1 (hypothetisch).

Rote Linien bedeuten Inhibition. Erläuterungen siehe Text.

Ein entscheidendes, jedoch technisch komplexes Experiment zur weiteren mechanistischen Aufklärung der Unterdrückung der Selenoproteine durch Cholesterol wäre die differenzielle Isolierung der modifizierten und unmodifizierten Sec-tRNAs. Insbesondere wäre dabei das Vorkommen der isopentenylierten Base Adenosin (i⁶A in Position 37) interessant. Lamichhane et al. haben mittels small interfering RNA (siRNA) die Trit1 in menschlichen Zervixkarzinom-Epithelzellen (HeLa-Zellen) unterdrückt, wodurch nur noch etwa 40 % des Sec-tRNA-Pools isopentenyliert vorlag. Zwar wurden unter Selensupplementation die Levels an gesamtter Sec-tRNA angehoben, jedoch nahm dadurch ebenfalls das Ausmaß der betrachteten Modifikation i⁶A ab. Ähnliche Untersuchungen zur gesamten Sec-tRNA-Menge und zum darunter befindlichen Anteil an isopentenylierter Sec-tRNA in Cholesterol-manipulierten Zellen und Geweben würden starke Hinweise auf den Mechanismus des beobachteten Effekts der Selenoprotein-Suppression durch Cholesterol geben.

Da die besagte Isolation der modifizierten Sec-tRNAs im Rahmen der vorliegenden Arbeit als nicht durchführbar angesehen wurde, sollte stattdessen der beobachtete *in vivo*-Effekt als ebenfalls spezifisch durch Cholesterol induziert eingegrenzt werden. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit ein weiteres Tiermodell analysiert, nämlich sogenannte Diät-induzierte Adipositas-Mäuse (DIO). Dazu wurden Wildtyp-Black/6-Mäuse des gleichen Stammes wie die obigen Knockout-Mäuse analysiert, die über 20 Wochen mit einer hochkalorischen und Hochfett-Diät mit 60 % Fettgehalt gefüttert worden waren; Kontrollen erhielten eine reguläre Kost mit 10 % Fettanteil. Diese etablierte Diät, deren Zusammensetzung im Materialteil angegeben ist (Kapitel 2.3), induziert in den Mäusen Fettleibigkeit sowie eine dem Diabetes mellitus Typ II ähnliche Stoffwechselstörung. Diese DIO (60 %)-Mäuse zeigen unter anderem Veränderungen im Glucose-, Insulin- und Fettstoffwechsel und weisen Anzeichen einer Insulinresistenz auf (Surwit et al. 1988), und es wurden vergleichbare Veränderungen im Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel, wie bei Patienten mit Diabetes Typ II beobachtet (Schreyer et al. 1988). Im Vordergrund bei der Analyse stand die Frage, ob eine Selenoprotein-Modulation auch bei einer nonspezifisch induzierten Fettleibigkeit und allgemeinen Lipidstoffwechselstörung auftreten würde.

Die untersuchten männlichen Tiere wiesen im Gegensatz zu den ApoE- oder LDLR-defizienten Mäusen in der Tat keinen veränderten Cholesterolspiegel in der Leber auf (Abb. 20). Die GPx1- und GPx4-Expression (Abb. 21) in den Lebern der DIO (60 %)-Mäuse war sehr variabel, jedoch im Mittelwert im Gegensatz zu den Cholesterol-manipulierten Mäusen geringfügig erhöht statt erniedrigt. Dementsprechend kann man sagen, dass die Cholesterol-

werte in den Lebern von Hochfett-DIO-Mäusen trotz einer rapiden Gewichtszunahme und damit verbundenen Stoffwechseländerungen unverändert blieben, und es konnte kein supprimierender Effekt auf die Selenoprotein-Expression im Vergleich zu den Modellen der Hypercholesterolemie beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Selenoprotein-Effekt auch *in vivo* als cholesterolspezifisch zu betrachten ist.

Nachfolgend war es von Interesse, auch einige weniger gut charakterisierte Selenoproteine (s. Tab. 1) in beiden Tiermodellen zu untersuchen und miteinander zu vergleichen, da es für einige von ihnen Hinweise auf eine Rolle bei der hepatischen Pathogenese gibt. Somit wurden die Expressionsprofile von SelS und SelW analysiert (Abb. 22). Sie zeigten eine starke Expressionsveränderung in DIO (60 %)-Mäusen, aber interessanterweise ein gegenläufiges Muster: Selenoprotein S war signifikant erhöht, Selenoprotein W war signifikant reduziert.

Das Selenoprotein S ist im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und kann durch seinen Beitrag zur Qualitätskontrolle im ER das Ausmaß an sogenanntem ER-Stress modulieren. Das Protein sorgt dabei für die Rückfaltung fehlgefalteter Proteine bzw. kontrolliert die Menge fehlgefalteter sezernierter Proteine (Bellinger et al. 2009; Huang et al. 2010). Zum anderen ist bekannt, dass die Expression des Selenoproteins S durch genetische Polymorphismen im Promotor des Gens beeinflusst wird. Mit inflammatorischer Stimulation geht eine erhöhte Expression von Selenoprotein S einher, was wiederum zur Veränderung des Zytokinstatus beiträgt (Curran et al. 2005). Entsprechend wird für dieses Selenoprotein ein Zusammenhang zwischen seiner Expression, entzündlichen Reaktionen und dem Typ 2 Diabetes diskutiert (Yu et al. 2016).

Das in DIO (60 %)-Mäusen verringerte Selenoprotein W ist mit 9 kDa ein relativ kleines Protein, das im Muskel von besonderer Bedeutung ist (Whanger 2000). Es hat wie viele andere Selenoproteine antioxidative Eigenschaften, deren Funktion jedoch unklar ist. Da keine Erhöhung des Cholesterolspiegels in den Lebern der DIO (60 %)-Mäuse gefunden wurde, kann der Effekt der Expressionsreduktion des Selenoproteins W nicht einem Cholesterol-abhängigen Mechanismus zugeschrieben werden. Wahrscheinlich handelt es sich bei beiden Modulationen um organspezifische transkriptionelle Effekte (Kapitel 1.2).

Die Gegenkontrolle auf SelS und SelW in den Lebern der ApoE- oder LDLR-defizienten Mäuse zeigte in beiden Fällen ein erniedrigtes Niveau dieser Proteine an (Abb. 22). Es ist möglich, dass auch hier eine Unterdrückung der Selenoprotein-Translation durch Cholesterol vorlag wie bei den Glutathion-Peroxidasen. Über die Stellung von SelS und SelW in der Selenoprotein-Hierarchie ist jedoch bislang nichts bekannt.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass das Gesamtmuster der Selenoprotein-Expressionsveränderung in den beiden untersuchten Maus-Modellen deutlich unterschiedlich war, dass die *in vivo*-Effekte in ApoE- und LDLR-defizienten Mäusen wahrscheinlich cholesterolspezifisch waren, und dass es bei einer fettreichen Ernährung in der Maus nicht zwangsläufig zu einem erhöhten Lebercholesterol kommt, jedoch zu spezifischen Selenoprotein-Modulationen.

5.3 Inhibition der Selenoprotein-Synthese durch Cholesterol als mögliche Erklärung negativer Auswirkungen erhöhter Cholesterolspiegel im Menschen

I. Cholesterol und seine Assoziation mit Krankheiten und pathologischen Markern

Cholesterol ist eine der wichtigsten Substanzen im Stoffwechsel von Mensch und Tier. Trotz dieser übergeordneten physiologischen Bedeutung wird es schon seit langer Zeit durch seine wahrscheinliche Assoziation mit kardiovaskulären Krankheiten fast schon als ‘‘Schadstoff‘‘ eingestuft. Bestimmte, erhöhte LDL-Plasmakonzentrationen gelten dabei als zentrale Indikatoren für ein erhöhtes Atheroskleroserisiko und werden in Leitlinien als wichtige Kriterien für die Initiation einer entweder direkt cholesterolsenkenden oder in neuerer Zeit auch anderweitig anti-atherosklerotischen Therapie (z.B. Blutdrucksenkung, antidiabetische Therapie, anti-inflammatorische Therapie) herangezogen (Waters et al. 2017). Andererseits zeigt sich an der Tatsache, dass im letzten Jahrzehnt verschiedene Fachgesellschaften ihre Cholesterol-Ernährungsempfehlung abgeschwächt oder abgeschafft haben (Eckel et al. 2014; Kim and Campbell 2018), dass auch auf diesem mutmaßlich sehr gut erforschten Feld noch viele Dinge unbekannt sind. Argumente, die zur Abschwächung der Cholesterolempfehlungen geführt haben, waren dabei die geringe Beeinflussung des Plasma-Cholesterols durch Nahrungs-Cholesterol, die geringe Resorption des Cholesterols aus Eiern, der ansonsten hohe Nährwert von Eiern sowie die Erkenntnis, dass die Assoziation des Plasma-Cholesterols mit dem Atheroskleroserisiko weitaus individueller ist als zunächst angenommen und überwiegend Männer mittleren Alters betraf, überraschenderweise im Gegensatz zur Senkung des Atheroskleroserisikos durch Statine (‘‘Cholesterolsenker‘‘), welche letztlich in allen Populationen vorzufinden war (Hamazaki et al. 2015; Kim and Campbell 2018; Collins et al. 2003).

Interessanterweise sind im gleichen Zuge, in welchem die zentrale Rolle des Plasmacholesterols für die Atherosklerose-Entstehung relativiert werden musste, neue Assoziationen von Krankheiten mit Cholesterol oder seinen Metaboliten hinzugekommen, beispielsweise neuro-

generative Krankheiten wie die Alzheimersche Krankheit (Bjorkhem et al. 2006; Reid et al. 2007; Gamouch et al. 2016; Broce et al. 2018) oder die Parkinsonsche Krankheit (Hu et al. 2008). Ferner weisen präklinische Untersuchungen auf einen Zusammenhang von bestimmten Cholesterolmetaboliten mit Tumorerkrankungen wie Brustkrebs hin, möglicherweise vermittelt durch spezifische Effekte auf nukleäre Hormonrezeptoren (Silvente-Poirot and Poirot 2014; Kuzu et al. 2016). Andererseits ist ein hohes LDL-Cholesterol in Europäern beiderlei Geschlechts, jedoch nicht in Afrikanern mit einem verringerten Typ-II-Diabetes-Risiko assoziiert (Feng et al. 2017). Ferner ist ein Zusammenhang von Hypercholesterolämie und verminderter Fertilität im Menschen beschrieben worden (Langheinrich et al. 2012). Es stellt sich angesichts dieser vielen, doch oft mechanistisch noch unscharfen Assoziationen die Frage, ob eine Beeinflussung der Selenoprotein-Expression für diese Assoziationen relevant und ursächlich sein könnte. Ein Hinweis hierauf ergibt sich aus dem wohl am häufigsten beschriebenen biochemischen Phänomen bei erhöhtem Cholesterol, oxidativem Stress.

II. Cholesterol und oxidativer Stress:

Wie bereits in vorherigen Kapiteln (1.3; 5.3) beschrieben, werden erhöhte Cholesterolspiegel im Blut als wesentliche Komponente für die Arteriosklerose betrachtet. Allerdings ist das als problematisch betrachtete, native LDL-Cholesterin wohl nur eine passive Komponente und als solches nicht an der Initiation der Arteriosklerose beteiligt. In einem intakten Gefäßsystem mit physiologischem Redoxstatus (d.h. ohne oxidativen Stress) und ohne inflammatorische Vorgänge wird auch ein erhöhter LDL-Spiegel in der Regel keine Arteriosklerose induzieren. Wesentliche Voraussetzungen dafür sind eine Endothelschädigung, eine proinflammatorische Stoffwechsellage und oxidativer Stress im Gefäßsystem (Galkina et al. 2008).

In Tierexperimenten von Enríquez-Cortina et al. 2017 konnte gezeigt werden, dass eine cholesterolreiche Diät in C57BL / 6-Mäusen einen erhöhten oxidativen DNA-Schaden in der Leber verursachte und bereits nach 7 Tagen mit einer Abnahme der wichtigsten DNA-Reparaturgene verbunden war. Auch im Modell der Hypercholesterolämie ApoE-KO-Mäusen wurden signifikant erhöhte Isoprostanwerte in Urin, Plasma und Gefäßgewebe gemessen (Practico et al. 1998).

In weiteren Studien von Küçükgergin et al. 2010 bewirkte eine Diät mit 4 % Cholesterol in Ratten einen signifikanten Anstieg des Cholesterol- und Triglyceridspiegels in Serum und Leber. Es erhöhte die Konzentration von Malondialdehyd und Dienkonjugat in Leber und Herz der hypercholesterolämischen Ratten. Andere Versuchen zeigten, dass die Langzeitfütte-

rung mit einer 1 % Cholesterin-Diät die Karzinogenese und den oxidativen Stress des Gewebes in der Prostata der Ratten fördert (Homma et al. 2004).

Die cholesterolreiche Diät (1 % Cholesterin) in Kaninchen führte ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der Malondialdehyd- und Dienkonjugat-Spiegel in Plasma, Leber und Aorta (Balkan et al. 2004a).

Mehrere epidemiologische Studien (Reilly et al. 1998; Davi et al. 1997; Balkan et al. 2004b; Martinez-Hervas et al. 2008) demonstrierten, dass die Probanden mit einem höheren atherogenen Risiko, ausgedrückt in hohen Gesamt-LDL-Cholesterinwerten, signifikant erhöhte Malondialdehyd und Dienkonjugat-Spiegel im Serum gegenüber den gesunden Probanden aufwiesen.

Letztendlich blieben die zitierten Arbeiten aber deskriptiv ohne mögliche Pathomechanismen für den Anstieg des oxidativen Stresses bei einer Hypercholesterolemie zu beleuchten.

Somit wurde die Ursache des oxidativen Stresses bei einer Hypercholesterolemie bis heute nicht aufgezeigt. Der Grund für den ROS-Anstieg könnte daran liegen, dass durch erhöhte Cholesterinspiegel die Expression von Proteinen wie der Gluthationperoxidasen vermindert wird, was in dieser Arbeit aufgezeigt wird.

Protektive Effekte der Selenoproteine, wie der Gluthationperoxidasen, gegenüber arterioskleroserelevanten Prozessen sind lange bekannt (Brigelius-Flohé R et al. 2005). Die wichtigste extrazelluläre Funktion der GPx1 bei der Entstehung der Atherosklerose ist ihre schützende Wirkung gegen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). GPx1 kann die ROS-vermittelte Oxidation von LDL inhibieren. Zusätzlich ist bekannt, dass ein Mangel an bioaktivem Stickoxid (NO) in GPx1-KO-Mäusen eine Endotheldysfunktion verursachen kann, was auf eine vaskulär schützende Wirkung der GPx1 hinweist (Lackner et al. 2004; Saito et al. 2007).

Somit eröffnet der in dieser Arbeit beschriebene Zusammenhang, eine spezifische Unterdrückung der antioxidativen Selenoproteine durch Cholesterin, einen plausiblen Mechanismus zur Erklärung des in der Literatur sehr oft als nonspezifische Cholesterin-Konsequenz zu findenden Phänomens „Oxidativer Streß“.

III. Hohes Cholesterin ist ein Atherosklerosemarker, niedriges Selen jedoch auch

Lässt sich der besagte Selenoprotein-Mechanismus auch im Speziellen mit der Atherosklerose in Verbindung bringen? In der Tat sind Selen und mutmaßlich bestimmte Selenoproteine seit

Längerem als vollwertige prognostische Marker für kardiovaskuläre Erkrankungen beschrieben worden, woraus sich im Endeffekt die bislang noch spekulative Hypothese ableiten ließe, dass die Assoziation dieser Erkrankungen mit Cholesterolemie über Selen vermittelt wird.

Verschiedene klinische und epidemiologische Studien haben einen Zusammenhang zwischen Selenmangel und einer Arteriosklerose oder einem Myokardinfarkt gezeigt (Benstoem et al. 2015). Entsprechend gibt es eine Liste von Selen-Supplementationsstudien, die die Bedeutung von Selen für kardiovaskuläre Krankheitsverläufe andeuten (Benstoem et al. 2015; Steinbrenner und Sies 2009). In spezifischer Weise wurde dabei in einer großen klinischen Studie die GPx1 als anscheinend unabhängiger Prediktor kardiovaskulärer Ereignisse etabliert (Blankenberg et al. 2003). Es wurde gezeigt, dass bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit unabhängig von den traditionellen Risikofaktoren der Arteriosklerose eine niedrige Aktivität des GPx1 in roten Blutzellen mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse einhergeht (Blankenberg et al. 2003). Eine inverse Korrelation zwischen der GPx1-Aktivität in der atherosklerotischen Läsion und der Atheroprogression wurde beim Menschen ebenfalls nachgewiesen (Lapenna et al. 1989).

Zuletzt soll erwähnt sein, dass nicht nur für die Arteriosklerose, sondern auch für andere klinisch relevante Phänotypen wie Fertilität, Krebs, Demenz oder Sepsis Korrelationen zwischen geringeren Plasmaselenkonzentrationen und der Häufigkeit der Erkrankung gezeigt worden sind, wobei in manchen Fällen auch Interventionsstudien einen solchen Zusammenhang ergeben haben (Hawkes et al. 2001; Gärtner et al. 2001; Sole und Jeejeebhoy 2002; Benstoem et al. 2015). In der Tat ist Selen sogar als generalisierter Langlebigkeitsfaktor diskutiert worden (Akbaraly et al. 2005).

IV. Selensupplementation kann das Cholesterolemie erhöhen

Eine, seit Langem bekannte, jedoch ebenfalls mechanistisch und funktionell noch unverstandene Beobachtung aus dem Feld der Selenbiochemie ist der Befund, dass eine Selensupplementation die Cholesterolemie und andere Plasmalipide beeinflussen kann, und zwar in der Regel in eine Richtung, die nach traditioneller Lesart eher unerwünscht wäre. Konkret wurde wiederholt beobachtet, eine Supplementierung mit Selen zu einem moderaten, doch messbaren Anstieg des LDL-Cholesterolemie führt (Laclaustra et al. 2010; Cold et al. 2015), so dass verschiedene Quellen sogar von einer Selensupplementation bei Hypercholesterolemie abgeraten haben. Andererseits gilt Selen selbst als kardioprotektiver Faktor wie im vorigen Abschnitt diskutiert.

Diese Diskrepanz ist im Moment nicht vollständig aufzulösen, jedoch ergeben sich hieraus zwei interessante Ansatzpunkte. Zum einen zeigen die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse – Unterdrückung der Selenoproteine durch Cholesterol – einen direkt reziproken Charakter zu den besagten Publikationen. Es ist somit möglich, dass es sich bei diesen beiden Phänomenen um die beiden Hälften eines vollständigen Regelkreises handelt: Eine Erhöhung des Selens auf ein hinreichendes Maß erhöhte nachfolgend physiologisch das Cholesterol oder ein Oxysterol, so dass es zu einer Hemmung der ansonsten möglicherweise zu hohen oder gar überschießenden Selenoprotein-Synthese kommt. Dadurch würden bestimmte negative Konsequenzen beispielsweise einer zu hohen GPx1-Synthese, die unter anderem mit dem Diabetes Typ II assoziiert ist, verhindert (McClung et al. 2004; Matouskova et al. 2018). Die evolutionäre Rolle einer solchen Regulation eines Spurenelements durch quantitatives Steroid erscheint jedoch nicht unmittelbar einsichtig.

Zum zweiten könnte es sein, dass die in der Literatur zu findenden klinischen Zusammenhänge durch den dort meist nicht beachteten Unterschied zwischen allgemeinem Selen und Selenoprotein-Selen verschleiert wurden. Es gibt nämlich Hinweise darauf, dass es bei einem gehemmten Selen-Einbau in Selenoproteine zu einer Erhöhung des nonspezifischen Selens kommt, so dass unter manchen Bedingungen ein „hohes Selen“ für eine ineffiziente Selenoprotein-Synthese stehen könnte.

Beispielsweise wurde in der Studie von Fülöp et al. (2013) die Selen-Konzentration in den Haaren von 81 Patienten mit Lipoproteinämien des Typs IIa und IIb analysiert. Nach Einteilung von Fredrickson ist der Typ IIa die reine, erblich bedingte Hypercholesterolämie, und Typ IIb ist eine kombinierte Hyperlipidämie. Sowohl der Cholesterolspiegel in Serum als auch der Selenspiegel in den Haaren war in beiden Erkrankungen gegenüber gesunden Probanden signifikant erhöht, was nach den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten bedeuten könnte, dass im Gewebe eine verringerte Selenoprotein-Expression vorlag, wie folgt.

In den verschiedenen Körperkompartimenten sind sehr unterschiedliche Selenkonzentrationen gefunden worden (Behne et al. 1988; Oster et al. 1988). Auch die Haare sind ein Kompartiment zur Selendistribution. Oster et al. (1988) konnten nachweisen, dass der Selengehalt der Haare von der täglichen Selenaufnahme abhängig ist, und fanden eine positive Korrelation für den Zusammenhang zwischen Haarselenkonzentration und Selenkonzentration in Serum, Vollblut und Urin. Somit ist die Bestimmung des Selenstatus der Haare repräsentativ für den Selen-Langzeit-Status im Organismus, sagt aber nicht unbedingt etwas über den spezifischen Einbau des Selens in Selenoproteine wie die GPx aus. Die Selenkonzentration in Vollblut,

Plasma und Erythrozyten korreliert sehr eng mit der Selenaufnahme des Organismus, und zwar sowohl bei niedriger als auch bei hoher Selenzufuhr. Die Messung des Selens im Blut ist damit der wichtigste Parameter zur Erhebung des unspezifischen Selenstatus (Lombeck et al. 1989; Nève 1991). Der Selengehalt der Erythrozyten ist dabei aufgrund der relativ langen Lebenszeit dieser Zellen als ein Langzeitparameter anzusehen, während die Selenwerte im Plasma eher kurzfristige Veränderungen widerspiegeln (Thomson 1983).

Somit müsste nun in der Regel als zusätzlicher Parameter zur Erfassung des funktionellen Selenstatus die Aktivitätsmessung des selenhaltigen Enzyms Glutathionperoxidase in Plasma und Erythrozyten herangezogen werden. Für die Bestimmung der Plasma- und Erythrozyten-Glutathionperoxidase konnte nachgewiesen werden, dass bei relativ niedriger Selenversorgung eine gute Korrelation zur Selenkonzentration des Blutes besteht (Levander 1986; Neve 1991). In der Regel wurden solche Aktivitätsmessungen der Glutathionperoxidase jedoch aus technischen Gründen nicht durchgeführt.

Die signifikante Steigerung der Haarselenkonzentrationen in der Studie von Fülöp et al. (2013) ließe sich also möglicherweise wie folgt erklären. Die Leber der Lipoproteinämie-Patienten ist durch die fehlende Isopentenylierung der Sec-tRNA nicht mehr in der Lage, das im Plasma hinreichend vorhandene Selen in die stressinduzierten Selenoproteine wie GPx einzubauen, wodurch das Plasmaselen ungenutzt bleibt, was sich sekundär in erhöhten Haarselenwerten zeigt. Der Spiegel an Haushalts-Selenoproteinen wie TrxR1 wäre wahrscheinlich unverändert, wobei die Glutathionperoxidasen, die eine entscheidende Rolle bei der Reduktion des oxidativen Stresses spielen, nicht in ausreichender Menge exprimiert würden. Hierdurch würde das Arteriosklerose-Risiko steigen, wie es für die Lipoproteinämien des Typs IIa und IIb bekannt ist.

Ein interessanter molekularer Hinweis darauf, dass Selenoproteine und Cholesterol auch in dieser Richtung (Se → Chol) regulatorisch miteinander verbunden sind, ergab sich aus Mäusen mit einem Knockout der Sec-tRNA in der Leber. Dieser bewirkte nicht nur einen Verlust an allen hepatischen Selenoproteinen, wodurch die Lebensdauer der Hepatozyten signifikant verringert wurde. Der Knockout ging auch mit einer erhöhten Cholesterolkonzentration im Plasma sowie einem gestiegenen Proteinspiegel an ApoE einher (Carlson et al. 2004). Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse machten deutlich, dass die Transkription von Genen, die in die Cholesterolbiosynthese involviert sind, induziert wurde. Dagegen waren Gene, die den Cholesterolabbau und -Transport regulieren, vermindert transkribiert. Die molekulare Ursache dieses Effekts besteht vielleicht darin, dass einer der Rezeptoren für ApoE, der Re-

zeptor ApoER2, auch gleichzeitig einer der wichtigsten Rezeptoren für das Selenoprotein P ist. Selenoprotein P wiederum ist die Haupttransportform von Selenocystein-Selen im Plasma. An welcher Stelle genau diese Doppelnutzung zu einer Interferenz und indirekt zu einer erhöhten Cholesterolkonzentration geführt hätte, ist jedoch nicht geklärt.

V. Ein Caveat: Plasma-Cholesterol versus Gewebs-Cholesterol

Ein nicht unwesentlicher Aspekt bei der Diskussion von klinischen Cholesterolspiegeln mit bestimmten Pathologien liegt darin, dass es sich bei den im Menschen gemessenen Werten fast ausnahmslos um Plasmawerte handelt. Relevant für die Modulation der Selenoprotein-Synthese durch negative Rückkopplung werden jedoch prinzipiell nur die jeweiligen Gewebs-Cholesterolspiegel sein. Vor einer generellen Parallelität zwischen diesen beiden Spiegeln kann jedoch keineswegs a priori ausgegangen werden. Beispielsweise waren in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mausgeweben die Plasma-Cholesterolspiegel sehr signifikant erhöht, die Leber-Gewebsspiegel nur moderat erhöht, wohingegen in der Niere und im Hoden keine Erhöhung gemessen wurde (Abb. 16, Abb. 18). Solche Unterschiede sind letztlich auch nicht überraschend, wenn man berücksichtigt, dass z.B. in LDLR-defizienten Mäusen der erhöhte Plasma-Cholesterolspiegel dadurch erst zustande kommt, dass die Leber weniger Cholesterol aus dem Plasma aufnimmt, was dazu führt, dass jüngere LDLR-defiziente Mäuse keinen erhöhten (Ishibashi et al. 1994) sondern einen niedrigeren (Kromer 2010) Leber-Gewebsspiegel aufweisen können. Um den Cholesterol-Gewebsspiegel einer Maus (oder eines Menschen) mit einem erhöhten Plasma-Cholesterolspiegel abschätzen zu können, muss also bekannt sein, wie jener zustande gekommen ist. Dies ist jedoch in der Klinik oft unbekannt.

Der Cholesterolmetabolismus im Gehirn ist ebenfalls autark und weitgehend unabhängig von den anderen Organen (Segatto et al. 2012). Andererseits könnten bestimmte Metabolite von Cholesterol wie Oxysterole Mediatoren einer somit indirekten Cholesterol-Selenoprotein-Beziehung sein, da diese Zellmembranen per Diffusion passieren können (Bjorkhem et al. 2006).

Oxysterole werden außer durch enzymatische Hydroxylierung auch bei der Lipidperoxidation gebildet (Smith 1996; Zieden et al. 1999). Verhagen et al. konnten in einem oxidativ modifizierten LDL, welches aufgrund seiner Zytotoxizität wohl eine zentrale Rolle in der Atherogenese aufweist, im Rahmen der Lipidperoxidation gebildete Oxysterole wiederfinden (Verhagen et al. 1996). Es konnten auch hohe Konzentrationen an Oxysterolen in atherogenen Läsi-

onen nachgewiesen werden (Suarna et al. 1995). Überwiegend waren dort jedoch Oxysterole zu finden, die im Vergleich zu den in dieser Arbeit untersuchten Oxysterolen durch direkte Einwirkung reaktiver Sauerstoffspezies entstehen (z.B. 7 β -Hydroxycholesterol (7 β -OH-Chol), 7-Ketocholesterol (7-Keto-Chol), Cholestantriol (3 β , 5 α , 6 β -trihydroxycholestan) und die epimeren Cholesterol-5,6-epoxide (Smith 1996). *In vitro*- und *in vivo*-Analysen hemmten sie interessanterweise auch das Enzym HMGCR ähnlich wie bei den in der Seitenkette hydroxylierten Oxysterolen (Kandutsch 1973).

VI. Statine und Cholesterol

Nach heutigem Kenntnisstand stützt sich die Hypothese des „bösen“ Cholesterols im Zusammenhang mit der Atherosklerose weit mehr auf die positiven Effekte der Statine und die dadurch fraglos bewirkte Absenkung des LDL-Cholesterols als auf eine direkte Korrelation von erhöhten Cholesterolspiegeln mit der Erkrankung (Nissen et al. 2005; Wiviott und Cannon 2006; Hamazaki et al. 2015; Feingold et al. 2016).

Nun besitzen Statine jedoch eine ganze Reihe von sogenannten pleiotropen Effekten, also Effekten, die man nicht oder zumindest nicht direkt auf die Cholesterolsenkung zurückführen kann, unter anderem eine Verbesserung der Endothelfunktion durch Erhöhung der lokalen Verfügbarkeit von NO (Stickstoffmonoxid), eine antioxidative Wirkung mit Reduktion der Oxidation des LDLs sowie entzündungshemmende, antiproliferative und plaque-stabilisierende Wirkungen (Feingold et al. 2016). Könnte es sein, dass einige dieser höchst relevanten Effekte auf einer Modulation der Selenoprotein-Synthese beruhen?

Wenn man die Abbildungen 23 und 24 um die Wirkung der Statine erweitert, lässt sich sagen, dass Cholesterol bzw. Oxysterole die Selenoprotein-Synthese ähnlich wie Statine auch (Kromer et al. 2009; Fuhrmeister et al. 2012) hemmen (Abb. 26). Das geschieht auf einer posttranskriptionellen Ebene und wird durch physiologische oder leicht supra-physiologische Dosen bewirkt. Es handelt sich also um ein Drei-Körper-Problem, bei welchem ein Zielparame-ter (Selenoproteine) von zwei anderen Parametern gehemmt wird, wobei jedoch einer der Hemmer (Statine) auch die Synthese und damit die Hemmwirkung des anderen Hemmers (Cholesterol) hemmt. Solche Drei-Körper-Probleme lassen sich nicht mehr rein qualitativ beschreiben; es kommt vielmehr auf die quantitative Stärke der Kopplung der jeweiligen Effekte an. Wird also bei einer niedrigen Statindosis die direkte Hemmung der HMGCR entscheidend sein und die Selenoproteine senken, oder wird die Senkung des Cholesterols dominieren, welches dann die Selenoproteine nicht mehr limitiert, so dass diese steigen (Disinhibi-

tion)? Statine hemmen die Cholesterolsynthese jedoch kompetitiv an der HMGCR, was *in vitro* in der Regel dreistellig nanomolare Dosen erfordert (Kromer et al. 2009; Fuhrmeister et al. 2012). Solche Dosen werden klinisch zwar auch erreicht, jedoch nur unter Bedingungen eines inhibierten Abbaus, wie er für Patienten mit Statin-Nebenwirkungen üblich ist (Jacobson 2006). Die normalen Plasmadosen sind etwa um eine halbe bis eine Zehnerpotenz niedriger (Corsini et al. 1999). Daraus ergibt sich folgendes Bild: Unter normalen Bedingungen oder bei Hypercholesterolämie überwiegt bei Statingabe funktionell wohl der Effekt der Hemmung der Synthese von Cholesterin, welches selbst ein starker und physiologischer Hemmer der Selenoprotein-Synthese ist. Daraus könnte sich netto über einen bestimmten Konzentrationsbereich ein steigernder Effekt auf die Selenoprotein-Synthese ergeben (Abb. 27). Bei hohen Statindosen oder einer Statin-Unverträglichkeit z.B. durch eine Abbaustörung käme es zu einer eigenständigen, direkten Hemmung der Selenoprotein-Synthese durch Blockade der HMGCR (Abb. 27).

Somit könnte der Selenoprotein-Mechanismus zumindest bei niedrigen Statindosen eine Erklärung für ein Teil der positiven pleiotropen Effekte (Mascitelli et al. 2009) dieser Substanzklasse liefern. Mit steigender verabreichter Dosis jenseits eines Neutralpunktes würde jedoch das Risiko der Nebenwirkungen von Statinen stark steigen (Abb. 27), die nach heutigem Wissen mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Hemmung der Selenoprotein-Synthese zurückzuführen sind (Moosmann und Behl 2004; Baker 2005; Kromer et al. 2009; Fuhrmeister et al. 2012; Moßhammer et al. 2014). Insbesondere die häufigen Erhöhungen der Transaminasen sowie die Nutzungs-(Sport)-abhängigen Myopathien lassen sich sehr gut über eine fehlende Selenoprotein-Expression erklären.

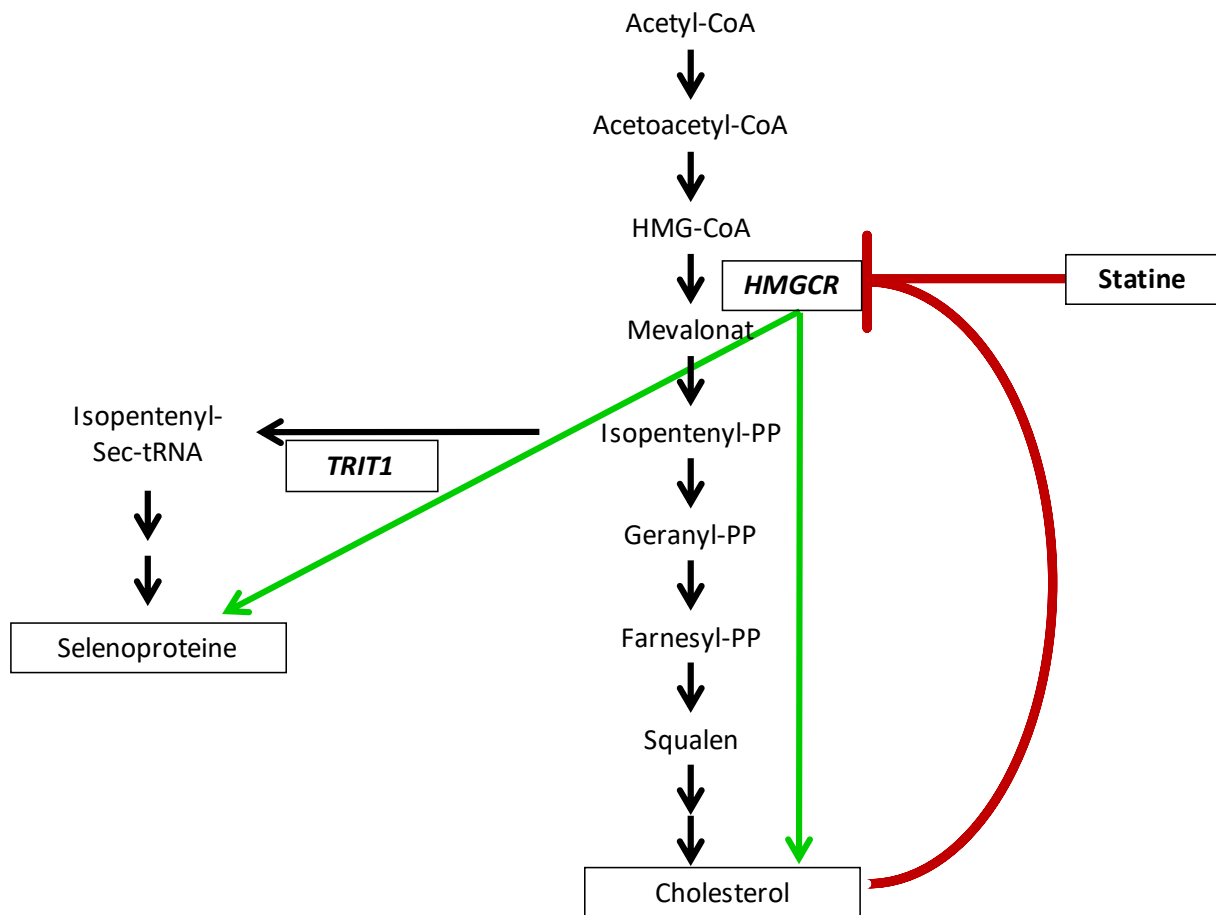


Abbildung 26. Regulation der Selenoprotein-Synthese unter Einfluss von Cholesterol und Statinen

In Rot ist die negative Rückkopplung durch Cholesterol und die Statinwirkung dargestellt. Grüne Pfeile bedeuten Induktion.

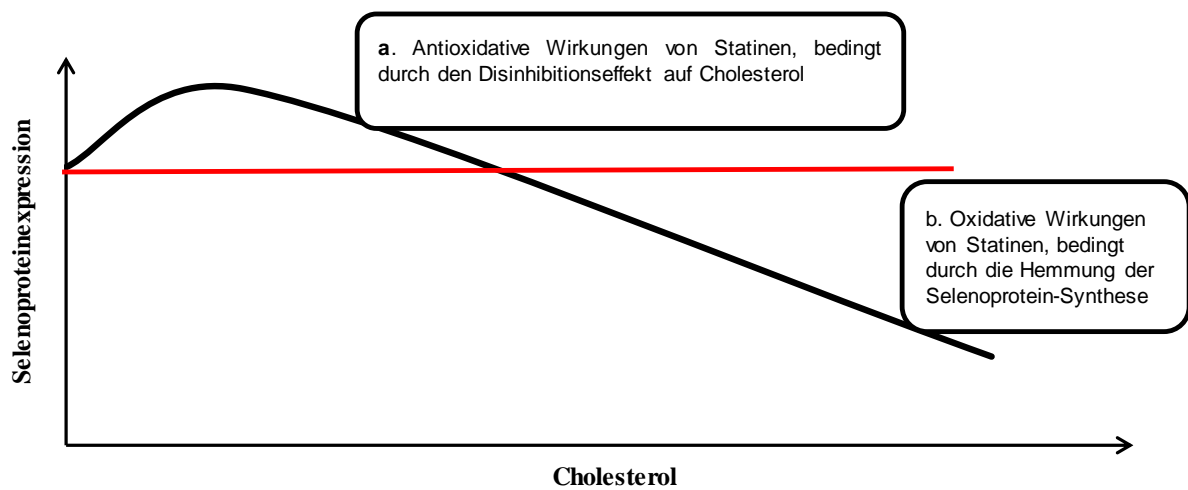


Abbildung 27. Modell für die gemeinsame Wirkung von Statinen und Cholesterol auf die Selenoprotein-Synthese

VII. Ferroptose als ein spezifischer Schadmechanismus bei mildem GPx4-Mangel:

Abschließend sei ein seit einigen Jahren wieder stark in der Literatur diskutierter spezifischer Mechanismus vorgestellt, die sogenannte Ferroptose (oder vormals Oxyptose), welcher nahelegt, dass eine auch nur teilweise Verringerung der Glutathion-Peroxidasen, insbesondere der GPx4, einen negativen Effekt auf diverse medizinisch relevante Phänomene degenerative Prozesse oder Tumorigenese haben könnte.

Glutathionperoxidasen sind involviert in den Abbau von Hydroperoxiden (z.B. H_2O_2) und damit in die Aufrechterhaltung der zellulären Redoxhomöostase. Die zelluläre GPx1 besteht dabei aus vier identischen Monomeren mit je einem Selen im aktiven Zentrum und katalysiert die Glutathion-abhängige Reduktion von H_2O_2 zu Wasser. Im Gegensatz zur GPx1 ist allein die GPx4 in der Lage, Phospholipid-Hydroperoxide wie Phosphatidylcholin-Hydroperoxide und Cholesterol-Hydroperoxide zu reduzieren (Hatfield et al. 2014a).

Mangel an GPx4 führt nun bekanntermaßen zur Anreicherung von möglicherweise spezifischen Lipidhydroperoxiden, die im Verdacht stehen, eine besondere Form des Zelltods auszulösen (Yang et al. 2014; Cao und Dixon 2016). Diese sogenannte Ferroptose ist eine semi-regulierte Form des Zelltods, die u.a. durch einen Aktivitätsverlust der GPx4 ausgelöst wird. Diese Form des letztlich auch Eisen-abhängigen Zelltods unterscheidet sich genetisch, biochemisch und morphologisch von anderen Zelltod-Modalitäten, einschließlich Apoptose und nicht regulierter Nekrose. Abbildung 25 zeigt einige der aktuell diskutierten Spieler.

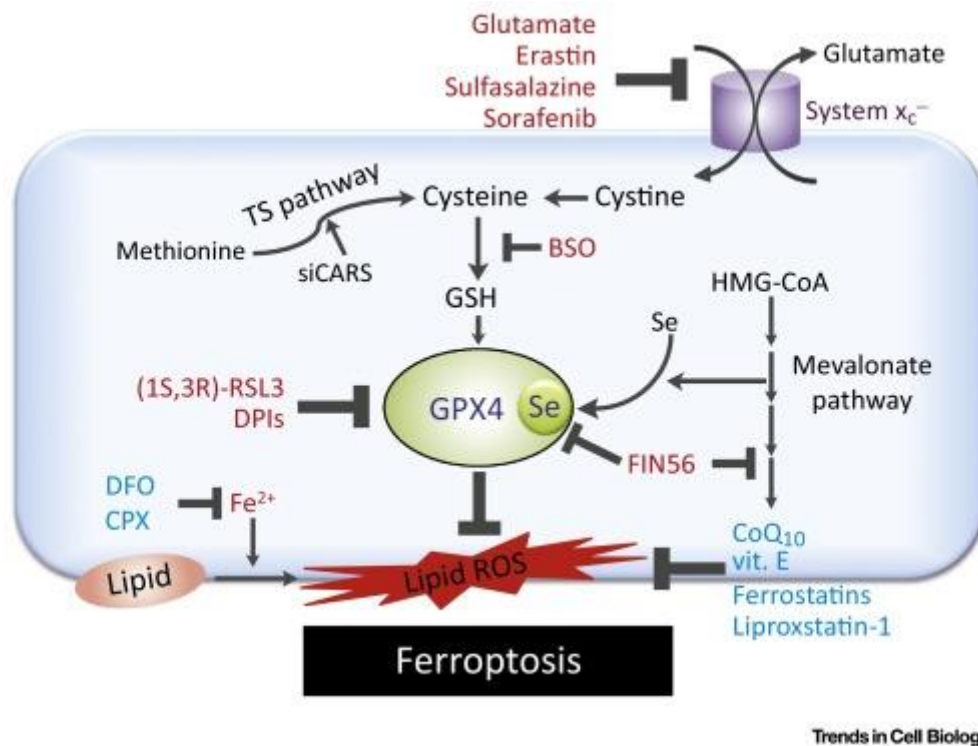


Abbildung 28. Molekulare Wege der Ferroptose-Regulation

Niedermolekulare Induktoren der Ferroptose sind rot gefärbt; Ferroptose-Inhibitoren sind blau gefärbt (Yang et al. 2015).

Die Besonderheit der Ferroptose soll nun darin bestehen, dass die nicht mehr effiziente Entfernung von Lipidhydroperoxiden, die im Menschen offenbar nur auf einem Enzym, der GPx4 basiert, zu einer Vielzahl von toxischen Zerfallsprodukten wie Elektrophilen oder neuerlich Radikalen führt, welche anschließend diverse Ziele wie DNA oder Membranproteine angreifen können (Yang et al. 2015). Oxidative Schäden an Biomolekülen wie Lipiden, Lipoproteinen und DNA gelten auch in der Tat als Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose (Yang et al. 2014; Rayman 2000), da beispielsweise entsprechende Schädigungen in ApoE-KO-Mäusen durch GPx4-Überexpression verringert werden konnten (Guo et al. 2008).

Darüber hinaus führte eine bedingte Deletion der GPx4 in T-Zellen in Mäusen zu einer T-Zell-Ferroptose, was nachfolgend zu einer unzureichenden Immunantwort auf eine Infektion führte (Matsushita et al. 2015). Dies legt nahe, dass die GPx4 für eine funktionelle, durch T-Zellen vermittelte Immunreaktion essentiell ist, was die Bedeutung des im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Expressionsrückgangs der GPx4 in T-Zellen unterstreicht. Zusammenfassend könnte dies bedeuten, dass eine Erhöhung des zellulären Cholesterols durch völlig verschiedene Mechanismen zu dem gemeinsamen Phänomen einer erhöhten Ferroptose-Neigung und damit zu einer erhöhten Neigung zu degenerativen Krankheiten führen könnte.

6 Zusammenfassung

Cholesterol ist eine essentielle Substanz im tierischen und menschlichen Organismus. Cholesterol wird in jeder Zelle durch den Mevalonatweg produziert und ist als Membranbestandteil für die Funktion und das Wachstum der Zellen von großer Bedeutung. Es existiert ein komplexes Netzwerk für die Regulation der Cholesterolsynthese, indem Cholesterol selbst und mehrere seiner Metabolite potente Inhibitoren der eigenen Synthese sind.

Der Mevalonatweg liefert neben Cholesterol viele Zwischenprodukte für andere essentielle Zwecke. Eines dieser Zwischenprodukte, Isopentenylpyrophosphat, wird zur Reifung der Selenocystein-tRNA und somit zur Expression der Selenoproteine benötigt. Das Fehlen dieser Modifikation resultiert in einer reduzierten Expression speziell der stressinduzierbaren Selenoproteine wie der Glutathionperoxidasen (GPx).

Die Ergebnisse in dieser Arbeit belegen einen funktionellen Zusammenhang zwischen Cholesterol- und Selenoprotein-Synthese und zeigen eine Unterdrückung der Selenoprotein-Expression durch Cholesterol und Oxysterole über einen post-transkriptionellen Mechanismus auf. Dieser Effekt ließ sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachten.

Zwei von vier *in vitro* untersuchten Oxysterolen, nämlich 22-Hydroxycholesterol und 25-Hydroxycholesterol, erwiesen sich in klonalen humanen Hepatozyten und T-Zellen als potente Supressoren der Expression der Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathionperoxidase GPx4. Mildere Effekte wurden bezüglich der Cytosolischen Glutathionperoxidase GPx1 beobachtet. Das essentielle Haushalts-Selenoprotein Thioredoxin-Reduktase 1 (TrxR1) blieb bei Behandlung mit allen vier Hydroxysterolen in beiden Zelllinien konstant.

Eine negative Kopplung zwischen Cholesterol und bestimmten Selenoproteinen konnte auch *in vivo* verifiziert werden. In zwei etablierten Mausmodellen der Hypercholesterolämie wurde eine deutliche Veränderung der hepatischen Selenoprotein-Expression festgestellt, wobei wiederum die GPx1 und die GPx4 von einer signifikant verringerten Expression betroffen waren. Die reduzierte Expression der beiden Glutathionperoxidasen in der Leber korrelierte mit einem erhöhten Gewebs-Cholesterol in diesen Tieren. In den Lebern von nicht-transgenen Mäusen, die aufgrund einer Fütterung mit einer Hochfett-Diät übergewichtig und prädiabetisch waren, aber keine erhöhten hepatischen Cholesterolwerte aufwiesen, konnte hingegen kein negativer Effekt auf die GPx1- und GPx4-Expression festgestellt werden. Diese Befunde

deuten darauf hin, dass der negative Selenoprotein-Effekt einer Hypercholesterolämie auch *in vivo* als cholesterolspezifisch zu betrachten ist.

Mechanistisch ergaben Messungen der Selenoprotein-Transkription in den untersuchten Tiermodellen sowie in den Zellkultur-Experimenten keinerlei Unterschiede, so dass ein posttranskriptioneller Effekt vorgelegen haben muss. Die Möglichkeit einer Selenocystein-tRNA-Reifungsstörung durch einen Mangel an Isopentenylpyrophosphat wird als wohl plausibelster Mechanismus der beobachteten Selenoprotein-Suppression diskutiert. Der Mangel an Isopentenylpyrophosphat wäre dabei durch die negative Hemmung des Mevalonatwegs durch Cholesterol zustande gekommen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse könnten einen Beitrag zur Erklärung der Arterioskleroseentstehung im Menschen leisten. Diese Erkrankung sowie andere mit erhöhten Cholesterolkonzentrationen assoziierte Pathologien können mechanistisch durch eine chronische Unterdrückung der Selenoprotein-Synthese mitverursacht sein.

Inwieweit diese Befunde quantitativ auf den Menschen übertragbar sind, muss in nachfolgenden Untersuchungen überprüft werden. Dennoch sprechen mehrere große epidemiologische und Interventionsstudien, die einen inversen Zusammenhang zwischen dem Plasma-Selenspiegel und dem Cholesterolspiegel gezeigt haben, klar dafür, dass auch im Menschen eine gegenseitige Regulation von Cholesterol und Selenoproteinen existiert.

7 Summary

Cholesterol is an essential substance in animals and humans. Cholesterol is produced in each cell by the mevalonate pathway and is of great importance as a membrane component essential for cell function and growth. There is a complex network for the regulation of cholesterol synthesis consisting of multiple feedback loops by which the products of the mevalonate pathway inhibit their exceeding synthesis. Besides cholesterol, the mevalonate pathway provides many other indispensable products like isopentenyl pyrophosphate, an isoprenoid which is required for the maturation of the selenocysteine tRNA and, thus, for the expression of the selenoproteins. Absence of this modification results in a specifically reduced expression of stress-inducible selenoproteins such as the glutathione peroxidases (GPx).

The results in this work demonstrate a functional relationship between cholesterol and selenoprotein synthesis and show a suppression of selenoprotein expression by cholesterol and oxysterols via a post-transcriptional mechanism. This effect was observed both *in vitro* and *in vivo*.

Two of the four oxysterols investigated in this work, namely 22-hydroxy-cholesterol und 25-hydroxy-cholesterol, acted as potent suppressors of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx4) expression in clonal human hepatocytes clonal human T cells. Cytosolic glutathione peroxidase (GPx1) was also negatively affected, but to a lesser degree. The indispensable household selenoprotein thioredoxin reductase 1 (TrxR1), in contrast, remained constant with all four oxysterols in both cell lines. This cell-specific negative coupling between oxysterols and certain selenoproteins could also be observed *in vivo*. In the liver of two transgenic mouse models of hypercholesterolemia, a similar change in selenoprotein expression was observed, with GPx1 and GPx4 being significantly affected. In parallel, increased tissue cholesterol concentrations were observed in the analyzed livers. In the livers of non-transgenic, but obese and prediabetic mice being fed a high-fat diet, the levels of both glutathione peroxidases were unaltered, as were hepatic tissue cholesterol concentrations. This suggests that the suppressive effect on selenoprotein expression may indeed have been cholesterol-specific.

Mechanistically, measurements of selenoprotein transcription in the investigated animal models showed no differences, as was the case for the cell culture experiments. These data indicate the relevance of a post-transcriptional mechanism to account for the observed selenoprotein modulation. Most likely, the elevated cholesterol levels led to negative feedback inhibition of the mevalonate pathway and thereby to a lack of isopentenyl pyrophosphate. The latter

compound would have then been insufficient for the complete maturation of the cellular selenocystein tRNA.

The insight gained in this work may contribute to a better understanding of the etiology of arteriosclerosis and other cholesterol-associated diseases in humans. In fact, a variety of pathologies related to heightened cholesterol levels may be explained at least in part by a suppression of selenoprotein synthesis.

In how far these findings can be translated to the clinical situation has yet to be determined. Nevertheless, several large epidemiological and intervention studies which have shown an inverse relationship between plasma selenium levels and cholesterol levels clearly indicate that a reciprocal regulation of cholesterol and selenoproteins is also operable in humans.

8 Literaturverzeichnis

- Adams CM1, Reitz J, De Brabander JK, Feramisco JD, Li L, Brown MS, Goldstein JL. 2004.** Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs. *J Biol Chem.* 279(50):52772-52780.
- Akbaraly NT, Arnaud J, Hininger-Favier I, Gourlet V, Roussel AM. 2005.** Selenium and mortality in the elderly: results from the EVA study Berr C.*Clin Chem.* 51(11):2117-2123.
- Ando H, Tsuruoka S, Yamamoto H, Takamura T, Kaneko S, Fujimura A. 2004.** Effects of pravastatin on the expression of ATP-binding cassette transporter A1.*J Pharmacol Exp Ther.* 311(1):420-425.
- Angstwurm MW, Engelmann L, Zimmermann T, Lehmann C, Spes CH, Abel P, Strauss R, Meier-Hellmann A, Insel R, Radke J, Schüttler J, Gärtner R. 2007.** Selenium in Intensive Care (SIC): results of a prospective randomized, placebo-controlled, multiple-center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock.*Crit Care Med.* 35(1):118-126.
- Anitschkow N. 1933.** Experimental arteriosclerosis in animals. *Virchows Archiv, Springer*
- Aytan N, Jung T, Tamtürk F, Grune T, Kartal-Ozer N. 2008.** Oxidative stress related changes in the brain of hypercholesterolemic rabbits. *Biofactors.* 33(3):225-236.
- Baker SK. 2005.** Molecular clues into the pathogenesis of statin-mediated muscle. *Muscle Nerve.* 31(5):572-580.
- Balkan J, Doğru-Abbasoğlu S, Aykaç-Toker G, Uysal M. 2004a.** The effect of a high cholesterol diet on lipids and oxidative stress in plasma, liver and aorta of rabbits and rats.*Nutrition Research,* 24(3), 229-234.
- Balkan J, Doğru-Abbasoğlu S, Aykaç-Toker G, Uysal M. 2004b.** Serum pro-oxidant-antioxidant balance and low-density lipoprotein oxidation in healthy subjects with different cholesterol levels. *Clin Exp Med.* 3(4):237-242.
- Barcelos RP, Portella Rde L, da Rosa EJ, Fonseca Ade S, Bresolin L, Carratu V, Soares FA, Barbosa NV. 2011.** Thiosemicarbazone derivate protects from AAPH and Cu²⁺-induced LDL oxidation. *Life Sci.* 89(1-2):20-28.
- Bauman DR, Bitmansour AD, McDonald JG, Thompson BM, Liang G, Russell DW. 2009.** 25-Hydroxycholesterol secreted by macrophages in response to Toll-like receptor activation suppresses immunoglobulin A production.*Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(39):16764-16769.
- Beck MA, Levander OA, Handy J. 2003.** Selenium deficiency and viral infection. *J Nutr* 133(1):1463-1467.
- Behne D, Wolters W. 1983.** Distribution of selenium and glutathione peroxidase in the rat. *J Nutr.* 113(2):456-461.

- Behne D1, Hilmert H, Scheid S, Gessner H, Elger W. 1988.** Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins. *Biochim Biophys Acta.* 966(1):12-21.
- Behne-D, Hofer-Bosse-T. 1984.** Effects of a low selenium status on the distribution and retention of selenium in the rat. *J Nutr.* 114 (7):1289-1296.
- Bellinger FP, Raman AV, Reeves MA, Berry MJ. 2009.** Regulation and function of selenoproteins in human disease. *Biochem J.* 422(1):11-22.
- Benstoem C, Goetzenich A, Kraemer S, Borosch S, Manzanares W, Hardy G, Stoppe C. 2015.** Selenium and its supplementation in cardiovascular disease--what do we know? *Nutrients.* 27(5):3094-118.
- Biosci Biotechnol Biochem. 2002.** Improving effect of dietary taurine supplementation on the oxidative stress and lipid levels in the plasma, liver and aorta of rabbits fed on a high-cholesterol diet. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66(8):1755-1758.
- Bjorkhem I, Heverin M, Leoni V, Meaney S, Diczfalusy U. 2006.** Oxysterols and Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand:* 114(185):43-49.
- Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L, Smieja M, Cambien F, Meyer J, Lackner. 2003.** Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 349(17):1605-1613.
- Breslow JL. 1996.** Mouse models of atherosclerosis. *Science.* 272(5262):685-8.
- Brigelius-Flohé R, Kluth D, Banning A. 2005.** Is there a future for antioxidants in atherogenesis? *Mol Nutr Food Res.* 49:1083-1089.
- Brigelius-Flohé R. 1999.** Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med.* 27(9-10):951-965.
- Brigelius-Flohé R1, Maiorino M. 2012.** Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta.* 1830(5):3289-33.
- Broce IJ, Tan CH, Fan CC, Jansen I, Savage JE, Witoelar A, Wen N, Hess CP, Dillon WP, Glastonbury CM, Glymour M, Yokoyama JS, Elahi FM, Rabinovici GD, Miller BL, Mormino EC, Sperling RA, Bennett DA, McEvoy LK, Brewer JB, Feldman HH, Hyman BT, Pericak-Vance M, Haines JL, Farrer LA, Mayeux R, Schellenberg GD, Yaffe K, Sugrue LP, Dale AM, Posthuma D, Andreassen OA, Karch CM, Desikan RS. 2019.** Dissecting the genetic relationship between cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 137(2):209-226.
- Brown MS, Goldstein JL. 2009.** Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J Lipid Res.* 50 Suppl:15-27.
- Bucher NL, McGarrah K, Gould E, Loud AV. 1959.** Cholesterol biosynthesis in preparations of liver from normal, fasting, x-irradiated, cholesterol-fed, triton, or delta 4-cholesten-3-one-treated rats. *J Biol Chem.* 234(2):262-267.

- Burg JS, Espenshade PJ. 2011.** Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Prog Lipid Res.* 50(4):403-410.
- Burk RF, Hill KE, Motley AK, Winfrey VP, Kurokawa S, Mitchell SL, Zhang W. 2014.** Selenoprotein P and apolipoprotein E receptor-2 interact at the blood-brain barrier and also within the brain to maintain an essential selenium pool that protects against neurodegeneration. *FASEB J.* 28(8):3579-3588.
- Burk RF, Hill KE. 2009.** Selenoprotein P-expression, functions, and roles in mammals. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1790: 1441-1447.
- Cambien F, Meyer J, Lackner KJ. 2003.** Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 349:1605-1613.
- Cao, J. Y. und Dixon, S. J. 2016.** Mechanisms of ferroptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 73:2195–2209.
- Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, Joyal SV, Hill KA, Pfeffer MA, Skene AM. Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 Investigators. 2004.** Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *Engl J Med.* 350(15):1495-1504.
- Carlson BA, Novoselov SV, Kumaraswamy E, Lee BJ, Anver MR, Gladyshev VN, Hatfield DL. 2004.** Specific excision of the selenocysteine tRNA [Ser] Sec (Trsp) gene in mouse liver demonstrates an essential role of selenoproteins in liver function. *J Biol Chem.* 279(9):8011-8007.
- Carlson BA, Xu XM, Gladyshev VN, Hatfield DL. 2004.** Selective rescue of selenoprotein expression in mice lacking a highly specialized methyl group in selenocysteine tRNA. *J Biol Chem.* 280(7):5542-5548.
- Chiarla C, Giovannini I, Siegel JH. 2004.** The relationship between plasma cholesterol, amino acids and acute phase proteins in sepsis. *Amino Acids.* 27(1):97-100.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-159.
- Christensen MJ1, Burgener KW. 1992.** Dietary selenium stabilizes glutathione peroxidase mRNA in rat liver. *J Nutr.* 122(8):1620-6.
- Chu YF1, Liu RH. 2005.** Cranberries inhibit LDL oxidation and induce LDLreceptor expression in hepatocytes. *Life Sci.* 77(15):1892-18901.
- Chukkapalli, V, Heaton, NS, Randall, G. 2012.** Lipids at the interface of virus-host interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 15:512–518.
- Claxton AJ, Jacobs DR Jr, Iribarren C, Welles SL, Sidney S, Feingold KR. 1998.** Association between serum total cholesterol and HIV infection in a high-risk cohort of young men. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 17(1):51-57.

- Cold F, Winther KH, Pastor-Barriuso R, Rayman MP, Guallar E, Nybo M, Griffin BA, Stranges S, Cold S. 2015.** Randomised controlled trial of the effect of long-term selenium supplementation on plasma cholesterol in an elderly Danish population. *Br J Nutr.* 114(11):1807-1818.
- Collins R, Armitage J, Parish S, Sleight P, Peto R; Heart Protection Study Collaborative Group. 2003.** MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 361(9374):2005-2016.
- Constans J, Seigneur M, Blann AD, Renard M, Resplandy F, Amiral J, Guérin V, Boisseau MR, Conri C. 1998.** Effect of the antioxidants selenium and beta-carotene on HIV-related endothelium dysfunction. *Thromb Haemost.* 80(6):1015-1017.
- Corsini A, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F. 2000.** New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther.* 84(3):413-428.
- Curran JE, Jowett JB, Elliott KS, Gao Y, Gluschenko K, Wang J, Abel Azim DM, Cai G, Mahaney MC, Comuzzie AG, Dyer TD, Walder KR, Zimmet P, MacCluer JW, Collier GR, Kissebah AH, Blangero J. 2005.** Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response. *Nat Genet.* 37(11):1234-1241.
- Daneschvar HL, Aronson MD, Smetana GW. 2015.** Do statins prevent Alzheimer's disease?. *Eur J Intern Med.* 26(9):666-669.
- Davi G, Alessandrini P, Mezzetti A, Minotti G, Bucciarelli T, Costantini F, Cipollone F, Bon GB, Ciabattini G, Patrono C. 1997.** In vivo formation of 8-Epi-prostaglandin F2 alpha is increased in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17(11):3230-3235.
- DeBose-Boyd RA, Ou J, Goldstein JL, Brown MS. 2001.** Expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) mRNA in rat hepatoma cells requires endogenous LXR ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(4):1477-82.
- de Haan JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RD, Cheung NS, Bronson RT, Silvestro MJ, Wild S, Zheng SS, Beart PM, Hertzog PJ, Kola I. 1998.** Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 273(35):22528-22536.
- Delalla, Elliott, Gofman. 1954.** Ultracentrifugal studies of high density serum lipoproteins in clinically healthy adults. *Am J Physiol.* 179(2):333-337.
- Dhingra S1, Bansal MP. 2006.** Modulation of hypercholesterolemia-induced alterations in apolipoprotein B and HMG-CoA reductase expression by selenium supplementation. *Chem Biol Interact.* 161(1):49-56.
- Diczfalusy U. 2013.** On the formation and possible biological role of 25-hydroxycholesterol. *Biochimie.* 95(3):455-460.

- Donald J. McNamara. 2015.** The Fifty Year Rehabilitation of the Egg. *Nutrients*. 7(10): 8716–8722.
- Dunham CM, Chirichella TJ. 2011.** Attenuated hypocholesterolemia following severe trauma signals risk for late ventilator-associated pneumonia, ventilator dependency, and death: a retrospective study of consecutive patients. *Lipids Health Dis*, 10:42.
- Dunham CM, Fealk MH, Sever WE, 2003.** Following severe injury, hypocholesterolemia improves with convalescence but persists with organ failure or onset of infection. *Crit Care*, 7(6): 145-153.
- Dzeletovic S, Breuer O, Lund E und Diczfalusy U: 1995.** Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry. *Anal Biochem*. 225(1):73-80.
- Eckel, R.H.; Jakicic, J.M.; Ard, J.D.; de Jesus, J.M.; Houston Miller, N.; Hubbard, V.S.; Lee, I.M.;Lichtenstein, A.H.; Loria, C.M.; Millen, B.E.; et al. 2014.** AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol*. 63:2960–2984.
- Eisenberg S. 1984.** High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res*. (10):1017-1158.
- Enríquez-Cortina C, Bello-Monroy O, Rosales-Cruz P, Souza V, Miranda RU, Toledo-Pérez R, Luna-López A, Simoni-Nieves A, Hernández-Pando R, Gutiérrez-Ruiz MC, Calvisi DF, Marquardt JU, Bucio L, Gomez-Quiroz LE. 2017.** Cholesterol overload in the liver aggravates oxidative stress-mediated DNA damage and accelerates hepatocarcinogenesis. *Oncotarget*. 8(61):104136-104148.
- Espenshade PJ, Hughes AL. 2007.** Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Genet*. 41:401-427.
- Fedacko J, Pella D, Fedackova P, Hänninen O, Tuomainen P, Jarcuska P, Lopuchovsky T, Jedlickova L, Merkovska L, Littarru GP. 2013.** Coenzyme Q (10) and selenium in statin-associated myopathy treatment. *Can J Physiol Pharmacol*. 91(2):165-170.
- Feingold KR, Funk JL, Moser AH, Shigenaga JK, Rapp JH, Grunfeld C. 1995.** Role for circulating lipoproteins in protection from endotoxin toxicity. *Infect Immun*. 63(5):2041-2046.
- Feingold KR, Grunfeld C. 2000-2016. Cholesterol Lowering Drugs.** In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, Vinik A, editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com.
- Feng Q, Wei W-Q, Chung C, Levinson R, Sundermann A, Mosley, Bastarache L, Ferguson J, Cox N, Roden D, Denny J, Linton M, Edwards D, Stein C. 2018.** Relationship between very low low-density lipoprotein cholesterol concentrations not due to statin therapy and risk of type 2 diabetes: A US-based cross-sectional observational study using electronic health records. *PLoS Med*. 15(8):1002642.

- Fessler MB. 2015.** Regulation of Adaptive Immunity in Health and Disease by Cholesterol Metabolism. *Curr Allergy Asthma Rep.* 15(8):48.
- Flint OP1, Masters BA, Gregg RE, Durham SK. 1997.** Inhibition of cholesterol synthesis by squalene synthase inhibitors does not induce myotoxicity in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol.* 145(1):91-98.
- Flores-Mateo G, Navas-Acien A, Pastor-Barriuso R, Guallar E. 2006.** Selenium and coronary heart disease: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 84(4):762-773.
- Fradejas N, Carlson BA, Rijntjes E, Becker NP, Tobe R, Schweizer U. 2013.** Mammalian Trt1 is a tRNA([Ser]Sec)-isopentenyl transferase required for full selenoprotein expression. *Biochem J.* 450(2):427-432.
- Fraunberger P, Schaefer S, Werdan K, Walli AK, Seidel D. 1999.** Reduction of circulating cholesterol and apolipoprotein levels during sepsis. *Clin Chem Lab Med.* 37 (3):357-362.
- Friedmann Angeli JP, Schneider M, Proneth B, Tyurina YY, Tyurin VA, Hammond VJ, Herbach N, Aichler M, Walch A, Eggenhofer E, Basavarajappa D, Rådmark O, Kobayashi S, Seibt T, Beck H, Neff F, Esposito I, Wanke R, Förster H, Yefremova O, Heinrichmeyer M, Bornkamm GW, Geissler EK, Thomas SB, Stockwell BR, O'Donnell VB, Kagan VE, Schick JA, Conrad M. 2014.** Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat Cell Biol.* 16(12):1180-1191.
- Fu Y, Cheng WH, Porres JM, Ross DA, Lei XG. 1999.** Knockout of cellular glutathione peroxidase gene renders mice susceptible to diquat-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 27(5-6):605-611.
- Fuhrmeister J, Tews M, Kromer A, Moosmann B. 2012.** Prooxidative toxicity and selenoprotein suppression by cerivastatin in muscle cells. *Toxicol Lett.* 215(3):219-227.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. 2004.** Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 114(12):1752-1761.
- Fülöp P, Seres I, Jenei Z, Juhász I, Paragh G. 2013.** Increased hair selenium concentration in hyperlipidemic patients. *J Cell Mol Med.* 17(3):350-355.
- Gaamouch F, Jing P, Xia J, Cai D. 2016.** Alzheimer's Disease Risk Genes and Lipid Regulators. *J Alzheimers Dis.* 53(1):15-29.
- Galan-Chilet I, Guallar E, Martin-Escudero JC, De Marco G, Dominguez-Lucas A, Gonzalez-Manzano I, Lopez-Izquierdo R, Redon J, Chaves FJ, Tellez-Plaza M. 2015.** Do genes modify the association of selenium and lipid levels? *Antioxid Redox Signal.* 22(15):1352-1362.
- Gallin JI, Kaye D, O'Leary WM. 1969.** Serum Lipids in Infection. *N Engl J Med.* 281:1081-1086.

- Ghittoni R1, Patrussi L, Pirozzi K, Pellegrini M, Lazzerini PE, Capecchi PL, Pasini FL, Baldari CT. 2005.** Simvastatin inhibits T-cell activation by selectively impairing the function of Ras superfamily GTPases. *FASEB J.* 19(6):605-607.
- Gil, G., Faust, J.R., Chin, D.J., Goldstein, J.L., und Brown, M.S. 1985.** Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme. *Cell.* 41:249-258.
- Goldstein JL, Brown M.S. 2015.** A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. *Cell.* 161(1):161-172.
- Goldstein JL, Brown MS. 1984.** Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. *J Lipid Res.* 25(13):1450-1461.
- Goldstein JL, Brown MS. 1990.** Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 343(6257):425-430.
- Goldstein JL, deBose-Boyd RA, Brown MS. 2006.** Protein sensors for membrane sterols. *Cell.* 124(1):35-46.
- Gould RG, Taylor CB, Haggerman JS, Warner I, Campbell DJ. 1953.** Effect of dietary cholesterol on the synthesis of cholesterol in dog tissue in vitro. *J. Biol. Chem.* 201:519-528.
- Goodin J, Manrique C, Duloherly M, Sampson J, Saettele M, Dabbagh O. 2011.** Effect of statins on the clinical outcomes of patients with sepsis. *Anaesth Intensive Care.* 39(6):1051-1055.
- Gutiérrez-García R, del Pozo T, Suazo M, Cambiazo V, González M. 2013.** Physiological copper exposure in Jurkat cells induces changes in the expression of genes encoding cholesterol biosynthesis proteins. *Biometals.* 26(6):1033-1040.
- Hamazaki T, Okuyama H, Ogushi Y, Hama R. 2015.** Towards a Paradigm Shift in Cholesterol Treatment. A Re-examination of the Cholesterol Issue in Japan. *Ann NutrMetab.* 4:1-116.
- Hasani M, Djalalinia S, Sharifi F, Varmaghani M, Zarei M, Abdar ME, Asayesh H, Noroozi M, Kasaeian A, Gorabi AM, Qorbani M. 2018.** Effect of Selenium Supplementation on Lipid Profile: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Horm Metab Res.* 50(10):715-727.
- Hawkes WC, Turek PJ. 2001.** Effects of dietary selenium on sperm motility in healthy men. *J Androl.* 22(5):764-772.
- Haynes SG, Feinleib M, Kannel WB. 1980.** The relationship of psychosocial factors to coronary heart disease in the Framingham Study. III. Eight-year incidence of coronary heart disease. *Am J Epidemiol.* 111(1):37-58.
- Hessvik NP, Bakke SS, Smith R, Ravna AW, Sylte I, Rustan AC, Thoresen GH, Kase ET. 2012.** The liver X receptor modulator 22(S)-hydroxycholesterol exerts cell-type specific effects on lipid and glucose metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 128(3-5):154-164.

- Heverin M, Bogdanovic N, Lütjohann D, Bayer T, Pikuleva I, Bretillon L, Diczfalusy U, Winblad B, Björkhem I. 2004.** Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease. *J Lipid Res.* 45(1):186-193.
- Heverin M, Hill E, Lyons P. R., Burk R. F. 1992.** Differential regulation of rat liver selenoprotein mRNAs in selenium deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185:260-263.
- Hill KE, Chittum HS, Lyons PR, Boeglin ME, Burk RF. 1996.** Effect of selenium on selenoprotein P expression in cultured liver cells. *Biochim Biophys Acta.* 1313(1):29-34.
- Holtmeier H.-J. [Cholesterin, Zur Physiologie, Pathophysiologie und Klinik. 1996.** Springer Verlag Berlin Heidelberg New York. ISBN 3-540-60671-8.
- Homma Y, Kondo Y, Kaneko M, Kitamura T, Nyou WT, Yanagisawa M, Yamamoto Y, Kakizoe T. 2004.** Promotion of carcinogenesis and oxidative stress by dietary cholesterol in rat prostate. *Carcinogenesis.* 25(6):1011-1004.
- Howe V, Sharpe LJ, Alexopoulos SJ, Kunze SV, Chua NK, Li D, Brown AJ. 2016.** Cholesterol homeostasis: How do cells sense sterol excess? *Chem Phys Lipids.* 199:170-178.
- Hu G, Antikainen R, Jousilahti P, Kivipelto M, Tuomilehto J. 2008.** Total cholesterol and the risk of Parkinson disease. *Neurology.* 70(21):1972-1979.
- Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, Brown MS, Goldstein JL, Wang X. 1993.** SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(24):11603-11607.
- Huang Z, Rose AH, Hoffmann PR. 2012.** The Role of Selenium in Inflammation and Immunity: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 16 (7):705–743.
- Hürlimann D, Enseleit F, Ruschitzka F. 2004.** Rheumatoide Arthritis, Inflammation und Atherosklerose. *Herz.* 29(8):760-768.
- Iribarren C, Jacobs DR, Jr., Sidney S, Claxton AJ, Feingold KR. 1998.** Cohort study of serum total cholesterol and in-hospital incidence of infectious diseases. *Epidemiol Infect.* 121(2):335-347.
- Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS. 1994.** The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in „knockout“ mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(10):4431-4445.
- Istvan ES, Palnitkar M, Buchanan SK, Deisenhofer J. 2000.** Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. *EMBO J.* 19(5):819-830.
- Jacobson M, Nair P, Naseem S, Smith T, Heald F. 1981.** Oxygenated Cholesterols: New risk factors for atherosclerosis? *Pediatric Research* 15. 535–535.

- Jacobson TA. 2009.** Myopathy with statin-fibrate combination therapy: clinical considerations. *Nat Rev Endocrinol.* 5(9):507-518.
- Jain MK, Ridker PM. 2005.** Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. *Nat Rev Drug Discov.* 4:977–987
- Kandutsch AA, Chen HW. 1973.** Inhibition of sterol synthesis in cultured mouse cells by 7alpha-hydroxycholesterol, 7beta-hydroxycholesterol, and 7-ketocholesterol. *J Biol Chem.* 248:8408-8417.
- Kasaikina MV, Hatfield DL, Gladyshev VN. 2012.** Understanding selenoprotein function and regulation through the use of rodent models. *Biochim Biophys Acta.* 1823(9):1633-1642.
- Hamazaki T, Okuyama H, Ogushi Y, Hama R. 2015.** Towards a Paradigm Shift in Cholesterol Treatment. A Re-examination of the Cholesterol Issue in Japan. *Ann Nutr Metab.* 66 (4):1-116.
- Kastelein JJ, Akdim F, Stroes ES, Zwinderman AH, Bots ML, Stalenhoef AF, Visseren FL, Sijbrands EJ, Trip MD, Stein EA, Gaudet D, Duivenvoorden R, Veltri EP, Marais AD, de Groot E. 2008.** Simvastatin with or without ezetimibe in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med.* 358(14):1431-1443.
- Kim and Campbell. 2018.** Dietary Cholesterol Contained in Whole Eggs Is Not Well Absorbed and Does Not Acutely Affect Plasma Total Cholesterol Concentration in Men and Women: Results from 2 Randomized Controlled Crossover Studies. *Nutrients.* 9:10(9).
- Knowles BB, Howe CC, Aden DP. 1980.** Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science.* 209(4455):497-499.
- Kobayashi S, Inoue N, Azumi H, Seno T, Hirata K, Kawashima S, Hayashi Y, Itoh H, Yokozaki H, Yokoyama M. 2002.** Expressional changes of the vascular antioxidant system in atherosclerotic coronary arteries. *J Atheroscler Thromb.* 9(4):184-190.
- Kosztá G, Fülesdi B. 2013.** Significance of selenium in the pathogenesis and therapy of cardiovascular diseases and those requiring intensive care. *Orvosi hetilap.* 154(41):1621-1627.
- Kromer A, Moosmann B. 2009.** Statin-induced liver injury involves cross-talk between cholesterol and selenoprotein biosynthetic pathways. *Mol Pharmacol.* 75(6):1421-1429.
- Kuipers F, van Ree JM, Hofker MH, Wolters H, In't Veld G, Havinga R, Vonk RJ, Princen HM, Havekes LM. 1996.** Altered lipid metabolism in apolipoprotein E-deficient mice does not affect cholesterol balance across the liver. *Hepatology.* 24(1):241-247.
- Kuzu OF, Noory MA, Robertson GP. 2016.** The Role of Cholesterol in Cancer. *Cancer Res.* 76(8):2063-70.

- Küçükgergin C, Aydın AF, Ozdemirler-Erata G, Mehmetçik G, Koçak-Toker N, Uysal M. 2010.** Effect of artichoke leaf extract on hepatic and cardiac oxidative stress in rats fed on high cholesterol diet. *Biol Trace Elem Res.* 135(1-3):264-274.
- Labunskyy V, Hatfield D, Gladyshev V. 2014.** Selenoproteins: Molecular Pathways and Physiological Roles. *Physiol Rev.* 2014 Jul; 94(3):739–777..
- Lackner KJ, Blankenberg S. 2004.** Atherosclerosis, oxidative stress and glutathione peroxidase-1:a new kid on the block. *Ital Heart J.* 5:169-172.
- Laclaustra M, Stranges S, Navas-Acien A, Ordovas JM, Guallar E. 2010.** Serum selenium and serum lipids in US adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2004. *Atherosclerosis.* 210(2):643-648.
- Lamichhane TN, Maraia RJ, Mattijssen, S. 2013.** Human cells have a limited set of tRNA anticodon loop substrates of the tRNA isopentenyltransferase TRIT1 tumor suppressor, *Molecular and Cellular Biology,* 33(24):4900–4908.
- Langheinrich AC, Paradowska A, Kilinski R, Kampschulte M, Steinfeld K, Altinkilic B, Steger K, Stieger P, Bergmann M, Weidner W. 2012.** Mixed testicular atrophy related to atherosclerosis: first lessons from the ApoE(-)/LDL receptor(-) double knockout mouse model. *Int J Androl.* 35(4):562-571.
- Lankin VZ, Tikhaze AK, Kukharchuk VV, Konovalova GG, Pisarenko OI, Kaminni AI, Shumaev KB, Belenkov YN. 2003.** Antioxidants decreases the intensification of low density lipoprotein in vivo peroxidation during therapy with statins. *Mol Cell Biochem.* 249(1-2):129-140.
- Lapenna D, de Gioia S, Ciofani G, Mezzetti A, Uchino S, Calafiore AM, Napolitano AM, Di Ilio C, F C. 1998.** Glutathione-related antioxidant defenses in human atherosclerotic plaques. *Circulation.* 97:1930-1934.
- LaRosa JC, He J, Vupputuri S. 1999.** Effect of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA.* 282(24):2340-2346.
- LaRosa JC, Grundy SM, Waters DD, Shear C, Barter P, Fruchart JC, Gotto AM, Greten H, Kastelein JJ, Shepherd J, Wenger NK. 2005.** Treating to New Targets (TNT) Investigators. Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease. *N Engl J Med.* 352(14):1425-1435.
- Lei KY1. 1991.** Dietary copper: cholesterol and lipoprotein metabolism. *Annu Rev Nutr.* 11:265-283.
- Lei, X.G., Evenson, J.K., Thompson, K.M., und Sunde, R.A. 1995.** Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium. *J. Nutr.* 125:1438–1446.
- Levander OA. 1986.** The need for measures of selenium status. *J Am Coll Tox.* 5:37-44
- Liao P, Hemmerlin A, Bach TJ, Chye ML. 2016.** The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production. *Biotechnol Adv.* 34(5):697-713.

- Lu J, Holmgren A. 2014.** The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med.*66:75-87.
- Makar RS, Lipsky PE, Cuthbert JA. 1994.** Non-sterol regulation of low density lipoprotein receptor gene expression in T cells. *J Lipid Res.* 35(10):1888-1895.
- Martinez-Hervas S, Fandos M, Real JT, Espinosa O, Chaves FJ, Saez GT, Salvador A, Cerdá C, Carmena R, Ascaso JF. 2008.** Insulin resistance and oxidative stress in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis.* 199(2):384-389.
- Martins IJ, Hone E, Foster JK, Sünram-Lea SI, Gnjec A, Fuller SJ, Nolan D, Gandy SE, Martins RN. 2006.** Apolipoprotein E, cholesterol metabolism, diabetes, and the convergence of risk factors for Alzheimer's disease and cardiovascular disease. *Mol Psychiatry.*11(8):721-736.
- Mascitelli L, Pezzetta F, Goldstein MR. 2009.** Are statin effects mediated through, or in spite of, their cholesterol-lowering action? *Angiology.* 60(2):262-263.
- Matoušková P, Hanousková B, Skálová L. 2018.** MicroRNAs as Potential Regulators of Glutathione Peroxidases Expression and Their Role in Obesity and Related Pathologies. *Int J Mol Sci.* 19(4):1199.
- Matsushita M1, Freigang S1, Schneider C1, Conrad M2, Bornkamm GW3, Kopf M4. 2015.** T-cell lipidperoxidation induces ferroptosis and preventsimmunity to infection. *J Exp Med.* 212(4):555-568.
- Maxfield FR1, van Meer G. 2010.** Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol.* 22(4):422-429.
- McClung JP, Roneker CA, Mu W, Lisk DJ, Langlais P, Liu F, Lei XG. 2004.** Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc Natl AcadSci U S A.* 101(24):8852-7.
- Miziorko HM. 2011.** Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 505:131–143.
- Moog C, Aubertin AM, Kirn A, Luu B. 1998.** Oxysterols, but not cholesterol, inhibit human immunodeficiency virus replication in vitro. *Antivir. Chem. Chemother.* 9:491–496.
- Moosmann B, Behl C. 2004.** Selenoprotein synthesis and side-effects of statins. *Lancet.* 363(9412):892-894.
- Moosmann B, Behl C. 2004.** Selenoproteins, cholesterol-lowering drugs, and the consequences: revisiting of the mevalonate pathway. *Trends Cardiovasc Med.* 14(7):273-281.
- Moriarty PM, Reddy CC, Maquat LE. 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(5):2932-2939.

- Morrow MP, Grant A, Mujawar Z, Dubrovsky L, Pushkarsky T, Kiselyeva Y, Jennelle L, Mukhamedova N, Remaley AT, Kashanchi F, Sviridov D, Bukrinsky M. 2010.** Stimulation of the liver X receptor pathway inhibits HIV-1 replication via induction of ATP-binding cassette transporter A1. *Mol. Pharmacol.* 78:215–225.
- Moßhammer D, Schaeffeler E, Schwab M, Mörrike K. 2014.** Mechanisms and assessment of statin-related muscular adverse effects. *Br J Clin Pharmacol.* 78(3):454-466.
- Muldoon MF, Herbert TB, Patterson SM, Kameneva M, Raible R, Manuck SB. 1995.** Effects of acute psychological stress on serum lipid levels, hemoconcentration, and blood viscosity. *Arch Intern Med.* 155(6):615-20.
- Nève JI. 1991.** Methods in determination of selenium states. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis.* 5(1):1-17.
- Nissen SE, Tardif JC, Nicholls SJ, Revkin JH, Shear CL, Duggan WT, Ruzyllo W, Bachinsky WB, Lasala GP, Tuzcu EM. 2007.** Effect of torcetrapib on the progression of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med.* 356(13):1304-1316.
- Nissen SE, Tuzcu EM, Brewer HB, Sipahi I, Nicholls SJ, Ganz P, Schoenhagen P, Waters DD, Pepine CJ, Crowe TD, Davidson MH, Deanfield JE, Wisniewski LM, Hanyok JJ, Kassalow LM. 2006.** ACAT Intravascular Atherosclerosis Treatment Evaluation (ACTIVATE) Investigators. Effect of ACAT inhibition on the progression of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med.* 354(12):1253-1263.
- Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Crowe T, Sasiela WJ, Tsai J, Orazem J, Magorien RD, O'Shaughnessy C, Ganz P. 2005.** Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 352(1):29-38.
- Novoselov SV, Calvisi DF, Labunsky VM, Factor VM, Carlson BA, Fomenko DE, Moustafa ME, Hatfield DL, Gladyshev VN. 2005.** Selenoprotein deficiency and high levels of selenium compounds can effectively inhibit hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Oncogene.* 24(54):8003-11.
- Oliveira J, Straliootto MR, Mancini G, Figueiredo CP, Braga AL, Teixeira JB, Bem AF. 2016.** Atheroprotective action of a modified organoselenium compound: in vitro evidence. *An Acad Bras Cienc.* 88(3):1953-1965.
- Osende JI, Ruiz-Ortega M, Blanco-Colio LM, Egido J. 2004.** Statins to prevent cardiovascular events in hypertensive patients. The ASCOT-LLA study. *Nephrol Dial Transplant.* 19(3):528-31.
- Osono Y, Woollett LA, Herz J, Dietschy JM. 1995.** Role of the low density lipoprotein receptor in the flux of cholesterol through the plasma and across the tissues of the mouse. *J Clin Invest.* 95(3):1124-1132.
- Oster O, Schmiedel G, Prellwitz W. 1988.** The organ distribution of selenium in German adults. *Biol Trace Elem Res.* 15:23-45.
- Pappas AC, Zoidis E, Surai PF, Zervas G. 2008.** Selenoproteins and maternal nutrition. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 151(4):361-372.

- Pezacki JP, Sagan SM, Tonary AM, Rouleau Y, Bélanger S, Supekova L, Su AI. 2009.** Transcriptional profiling of the effects of 25-hydroxycholesterol on human hepatocyte metabolism and the antiviral state it conveys against the hepatitis C virus. *BMC Chem Biol.* (16):9-2.
- Porter MW, Yamanaka W, Carlson SD, Flynn MA. 1977.** Effect of dietary egg on serum cholesterol and triglyceride of human males. *Am J Clin Nutr.* 30(4):490-495.
- Praticò D, Tangirala RK, Rader DJ, Rokach J, FitzGerald GA. 1998.** Vitamin E suppresses isoprostane generation in vivo and reduces atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Nat Med.* 4(10):1189-1192.
- Prummel MF, Strieder T, Wiersinga WM. 2004.** The environment and autoimmune thyroid diseases. *Eur J Endocrinol* 150(5):605-618.
- Quarfordt SH, Oswald B, Landis B, Xu HS, Zhang SH, Maeda N. 1995.** In vivo cholesterol kinetics in apolipoprotein E-deficient and control mice. *J Lipid Res.* 36(6):1227-1235.
- Radhakrishnan A, Goldstein JL, McDonald JG, Brown MS. 2008.** Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance. *Cell Metab.* 6:512-521.
- Raman AV, Pitts MW, Seyedali A, Hashimoto AC, Bellinger FP, Berry MJ. 2013.** Selenoprotein W expression and regulation in mouse brain and neurons. *Brain Behav.* 3(5):562-574.
- Ramezani A, Dubrovsky L, Pushkarsky T, Sviridov D, Karandish S, Raj DS1, Fitzgerald ML, Bukrinsky M. 2012.** Liver X receptor agonist inhibits HIV-1 replication and prevents HIV-induced reduction of plasma HDL in humanized mouse model of HIV infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 419:95-98.
- Ramkumar S, Raghunath A, Raghunath S. 2016.** Statin Therapy: Review of Safety and Potential Side Effects. *Acta Cardiol Sin.* 32(6):631-639.
- Rayman MP. 2002.** The argument for increasing selenium intake. *Proceedings of the Nutrition Society* 61, 203-215.
- Rayman MP. 2009.** Selenoproteins and human health: insights from epidemiological data. *Biochim Biophys Acta.* 1790(11):1533-1540.
- Rayman MP. 2012.** Selenium and human health. *Lancet.* 379(9822):1256-1268.
- Reid PC, Urano Y, Kodama T, Hamakubo T. 2007.** Alzheimer's disease: cholesterol, relevance to heart failure. *Herz.* 27(2):174-178.
- Reilly MP, Praticò D, Delanty N, DiMinno G, Tremoli E, Rader D, Kapoor S, Rokach J, Lawson J, FitzGerald GA. 1998.** Increased formation of distinct F2 isoprostanes in hypercholesterolemia. *Circulation.* 98(25):2822-2828.
- Robinson MF, Thomson CD. 1983.** The role of selenium in the diet. *Nutr. Abstr. Rev. in Clin. Nutr.*

- Rosch PJ. 2008.** Cholesterol does not cause coronary heart disease in contrast to stress. *Scand Cardiovasc J.* 42(4):244-249.
- Rose AH, Hoffmann PR. 2015.** Selenoproteins and cardiovascular stress. *Thromb Haemost.* 113(3):494-504.
- Ross R. 1995.** Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol.*57:791-804.
- Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, Faas FH, Linares E, Schaefer EJ, Schectman G, Wilt TJ, Wittes J. 1999.** Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med.* 341(6):410-418.
- Sacks FM, Pfeffer MA, Moya LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. 1996.** The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med.* 335(14):1001–1009.
- Saito Y1, Yoshida Y, Akazawa T, Takahashi K, Niki E. 2003.** Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. *J Biol Chem.*;278(41):39428-39434.
- Saito Y1, Yoshida Y, Niki E. 2007.** Cholesterol is more susceptible to oxidation than linoleates in cultured cells under oxidative stress induced by selenium deficiency and free radicals. *FEBS Lett.* 581(22):4349-4354.
- Sandrine Silvente-Poirot, Marc Poirot. 2014.** Cholesterol and Cancer, in the Balance. *Science.* 343(6718):1445-1446.
- Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. 1995.** Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med.* 333(20):1301-1307.
- Shepherd J, Blauw GJ, Murphy MB, Bollen EL, Buckley BM, Cobbe SM, Ford I, Gaw A, Hyland M, Jukema JW, Kamper AM, Macfarlane PW, Meinders AE, Norrie J, Packard CJ, Perry IJ, Stott DJ, Sweeney BJ, Twomey C, Westendorp RG. 2002.** PROspective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk. Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomised controlled trial. *Lancet.* 360(9346):1623-1630.;PROSPER study group.
- Schierwagen R, Uschner FE, Magdaleno F, Klein S, Trebicka J. 2017.** Rationale for the use of statins in liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 312(5):G407-G412.
- Schneider U, Schwenk H, Bornkamm G. 1977.** „Characterization of EBV-genome negative „null“ and „T“ cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma“. *Int J Cancer.* 19 (5): 621–626.

- Schoenheimer R, Breusch F. 1933.** Synthesis and destruction of cholesterol in the organism. *Journal of Biological Chemistry.* 103:439-448.
- Schoenmakers E, Carlson B, Agostini M, Moran C, Rajanayagam O, Bochukova E, Tobe R, Peat R, Gevers E, Muntoni F, Guicheney P, Schoenmakers N, Farooqi S, Lyons G, Hatfield D, Chatterjee K. 2016.** Mutation in human selenocysteine transfer RNA selectively disrupts selenoprotein synthesis. *J Clin Invest.* 126(3):992-996.
- Schreyer SA, Wilson DL, LeBoeuf RC. 1998.** C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 136(1):17-24.
- Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, Ballantyne CM, Barter PJ, Brumm J, Chaitman BR, Holme IM, Kallend D, Leiter LA, Leitersdorf E, McMurray JJ, Mundl H, Nicholls SJ, Shah PK, Tardif JC, Wright RS; 2012.** Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med.* 367(22):2089-2099.
- Segatto M, Trapani L, Lecis C, Pallottini V. 2012.** Regulation of cholesterol biosynthetic pathway in different regions of the rat central nervous system. *Acta Physiol.* 206(1): 62-71.
- Sengupta A, Carlson BA, Hoffmann VJ, Gladyshev VN, Hatfield DL. 2008.** Loss of housekeeping selenoprotein expression in mouse liver modulates lipoprotein metabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* 365(3):446-452.
- Shapiro DJ, Rodwell VW. 1971.** Regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol synthesis. *J Biol Chem.* 246(10):3210-3216.
- Shipman KE, Strange RC, Ramachandran S. 2016.** Use of fibrates in the metabolic syndrome. *World J Diabetes.* 7(5):74-88.
- Shrimali RK, Irons RD, Carlson BA, Sano Y, Gladyshev VN, Park JM, Hatfield DL. 2008.** Selenoproteins mediate T cell immunity through an antioxidant mechanism. *J Biol Chem.* 283(29):20181-20185.
- Siperstein MD, Guest MJ. 1960.** Studies on the site of the feedback control of cholesterol synthesis. *J Clin Invest.* 39:642-652.
- Smith. 1996.** Review of progress in sterol oxidations: 1987–1995. *Lipids.* 31:453-487:
- Smith MA, Sayre LM, Anderson VE, Harris PL, Beal MF, Kowall N and. Perry G. 1998.** Cytochemical demonstration of oxidative damage in Alzheimer disease by immunochemical enhancement of the carbonyl reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine, *J Histochem Cytochem.* 46:731-735.
- Sole MJ, Jeejeebhoy KN. 2002.** Conditioned nutritional requirements: therapeutic relevance to heart failure. *Herz.* 27(2):174-178.
- Spann NJ., Glass CK. 2013.** Sterols and oxysterols in immune cell function. *Nat Immunol.* 14(9):893-900.
- Steinbrenner H, Speckmann B, Pinto A, Sies H. 2011.** High selenium intake and increased diabetes risk: experimental evidence for interplay between selenium and carbohydrate metabolism. *J Clin Biochem Nutr.* 48(1):40-45.

- Steinbrenner H. 2013.** Interference of selenium and selenoproteins with the insulin-regulated carbohydrate and lipid metabolism. *Free Radic Biol Med.* 65:1538-1547.
- Steinbrenner H1, Sies H. 2009.** Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochim Biophys Acta.* 2009. 1790(11):1478-1485.
- Strandberg TE, Strandberg A, Rantanen K, Salomaa VV, Pitkälä K, Miettinen TA. 2004.** Low cholesterol, mortality, and quality of life in old age during a 39-year follow-up. *J Am Coll Cardiol.* 44(5):1002-1008.
- Suarna C, Dean RT, May J, Stocker R. 1995.** Human atherosclerotic plaque contains both oxidized lipids and relatively large amounts of a-tocopherol and ascorbate. *Arterioscler. Thromb.* 15:1616-1624.
- Surwit RS1, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN. 1988.** Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes.* 37(9):1163-1167.
- Tan SM, Sharma A, Yuen DY, Stefanovic N, Krippner G, Mugesh G, Chai Z, de Haan JB. 2013.** The modified selenenyl amide, M-hydroxy ebselen, attenuates diabetic nephropathy and diabetes-associated atherosclerosis in ApoE/GPx1 double knockout mice. *PLoS One.* 8(7):69193.
- 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(1):16-24.
- Vaya J, Schipper HM. 2007.** Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. *J Neurochem.* 102(6):1727-1737.
- Verhagen JC, ter Braake P, Teunissen J, van Ginkel G, Sevanian A. 1996.** Physical effects of biologically formed cholesterol oxidation products on lipid membranes investigated with fluorescence depolarization spectroscopy and electron spin resonance. *J Lipid Res.* 37(7):1488-1502.
- Veseli B, Perrotta P, De Meyer GRA, Roth L, Van der Donckt C, Martinet W, De Meyer GRY. 2017.** Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol.* 2999(17):30320-30325.
- Wang B, Sun J, Ma Y, Wu G, Shi Y, Le G. 2014.** Increased oxidative stress and the apoptosis of regulatory T cells in obese mice but not resistant mice in response to a high-fat diet. *Cell Immunol.* 288(1-2):39-46.
- Wang SR, Pessah M, Infante J, Catala D, Salvat C, Infante R. 1988.** Lipid and lipoprotein metabolism in Hep G2 cells. *Biochim Biophys Acta.* 961(3):351-63.
- Wang X, Wu H, Long Z, Sun Q, Liu J, Liu Y, Hai C. 2016.** Differential effect of Se on insulin resistance: regulation of adipogenesis and lipolysis. *Mol Cell Biochem.* 415(1-2):89-102.
- Waters DD, Boekholdt SM. 2017.** An Evidence-Based Guide to Cholesterol-Lowering Guidelines. 2017. *Can J Cardiol.* 33(3):343-349.
- Whanger PD. 2000.** Selenoprotein W: *Cell Mol Life Sci.* 57(13-14):1846-1852.

- Wilson RF, Barletta JF, Tyburski JG. 2003.** Hypcholesterolemia in sepsis and critically ill or injured patients. *Crit Care*, 7 (6):413-414.
- Wiviott SD, Cannon CP. 2006.** Update on lipid-lowering therapy and LDL-cholesterol targets. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 3(8):424-436.
- Xu G, Salen G, Shefer S, Ness GC, Nguyen LB, Parker TS, Chen TS, Zhao Z, DonnellyTM, TintGS. 1995.** Unexpected inhibition of cholesterol 7 alpha-hydroxylase by cholesterol in New Zealand white and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits, *J Clin Invest.*, 95(4):1497-1504.
- Yang, W. S., SriRamaratnam, R., Welsh, M. E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V. S., Cheah, J. H., Clemons, P. A., Shamji, A. F., Clish, C. B., Brown, L. M., Girotti, A. W., Cornish, V. W., Schreiber, S. L. und Stockwell, B. R. 2014.** Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*. 156(1-2):317-331.
- Yende S, Milbrandt EB, Kellum JA, Kong L, Delude RL, Weissfeld LA, Angus DC. 2011.** Understanding the potential role of statins in pneumonia and sepsis. *Crit Care Med*. 39(8):1871-1878.
- Yokozaki H, Yokoyama M. 2002.** Expressional changes of the vascular antioxidant system in atherosclerotic coronary arteries. *J Atheroscler Thromb*. 9:184-190.
- Yu SS, Men LL, Wu JL, Huang LW, Xing Q, Yao JJ, Wang YB, Song GR, Guo HS, Sun GH, Zhang YH, Li H, Du JL. 2016.** The source of circulating selenoproteinS and its association with type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis: a preliminary study. *Cardiovasc Diabetol*. 15:70.
- Zárate A, Manuel-Apolinar L, Saucedo R, Hernández-Valencia M, Basurto L. 2016.** Hypercholesterolemia As a Risk Factor for Cardiovascular Disease: Current Controversial Therapeutic Management. *Arch Med Res*. 47(7):491-495.
- Zeng, J., Wu, Y., Liao, Q., Li, L. & Chen, X. 2012.** Liver X receptors agonists impede hepatitis C virus infection in an Idol-dependent manner. *Antiviral Res*. 95:245–256.
- Zhou J, Huang K, Lei XG. 2013.** Selenium and diabetes--evidence from animal studies *Free Radic Biol Med*. 65:1548-1556.
- Zieden B, Kaminskas A, Kristenson M, Kucinskiene Z, Vessby B, Olsson A G, Diczfalusy U. 1999.** Increased plasma 7 beta-hydroxycholesterol concentrations in a population with a high risk for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 19(4):967-971.

9 Eigene Publikationen/Posterpräsentationen

Publikationen:

- **Fuhrmeister J, Tews M, Kromer A, Moosmann B. 2012.** Prooxidative toxicity and selenoprotein suppression by cerivastatin in muscle cells. *Toxicol.Lett.*215:219-227
- **Hartmann EK, Ziebart A, Thomas R, Lui T, Schad A, Tews M, Moosmann B, Kamuf J, Duenges B, Thal SC, David M. 2015.** Inhalation therapy with the synthetic TIP-like peptide AP318 attenuates pulmonary inflammation in a porcine sepsis model. *BMC Pulm.Med.*15, 7
- **Tews M et al. 2019.** Cholesterol is a post-transcriptional regulator of selenoprotein expression. Vor der Veröffentlichung

Posterpräsentation

- **Tews M, Kromer A, Moosmann B. 2013.** HMG-CoA Reductase Inhibitors as Modulators of Selenoprotein Expression and Redox Resilience, 10th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine 2013.

10 Danksagung

11 Lebenslauf

Persönliche Daten: