

**„Regulation der Selenoproteinsynthese
durch den Mevalonatweg“**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Biochemie

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

ANDREA KROMER
geb. in Malsch (Kreis Karlsruhe)

Mainz, Mai 2010

1	Einleitung	4
1.1	Selen	4
1.2	Selenoproteine	5
1.2.1	Glutathionperoxidasen	9
1.2.2	Thioredoxin Reduktasen	13
1.2.3	Selenoprotein P	15
1.3	Cholesterolmetabolismus	16
1.3.1	Mevalonatpfad	17
1.3.2	Lipoproteine	21
1.3.3	Krankheiten die mit dem Cholesterolmetabolismus assoziiert werden	22
1.3.4	Statine	24
1.4	Fragestellung	25
2	Materialien	27
2.1	spezielle Chemikalien	27
2.2	Antikörper	28
2.3	Geräte	28
2.4	Weitere Verbrauchsmaterialien	29
2.5	Puffer und Lösungen	29
2.6	Oligonukleotide	31
2.7	Zellen	31
2.8	Mäuse	31
2.9	Lösungen und Medien für die Zellkultur	32
3	Methoden	33
3.1	Zellkultur	33
3.2	Bestimmung der Zellzahl	33
3.3	Behandlung der HepG2-Zellen	33

3.4	Selenabhängigkeit der Selenoproteinexpression	34
3.5	Proteingewinnung und -quantifizierung	34
3.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
3.7	Western Blot	35
3.8	Immunologischer Protein-Nachweis auf Western-Blot-Ebene	36
3.9	Protein-Markierung mit ⁷⁵ Se	36
3.10	Reversibilitätsexperimente	37
3.11	Aktivitätsbestimmung der Glutathion-Peroxidase	37
3.12	Glutathion-Quantifizierung	38
3.13	Zellviabilitäts-Messung (MTT)	40
3.14	Messung reaktiver Sauerstoff-Spezies	40
3.15	Quantitative real-time RT-PCR	41
3.16	Aufreinigung von humanem LDL aus Vollblut	42
3.17	Inkubation mit LDL und Cholesterol-Derivaten	43
3.18	Experimente mit humanen Hautfibroblasten	43
3.19	Experimente mit mutanten Mäusen	44
3.20	Cholesterolbestimmung	44
4	Ergebnisse	46
4.1	Einfluss von Selen auf die Selenoproteinexpression	46
4.2	Einfluss der Statine auf die Selenoproteinexpression	47
4.2.1	Selenoproteinexpression nach Statinbehandlung	48
4.2.2	⁷⁵ Se-Markierung von Statin-behandelten HepG2-Zellen	49
4.2.3	Effekt von Statinen auf die Glutathionperoxidase-Aktivität, die Glutathionspiegel und die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in HepG2-Zellen	52
4.2.4	Viabilität von HepG2-Zellen nach Statinbehandlung in Abhängigkeit von Selen	55
4.2.5	Quantitative real-time RT-PCR nach Statinbehandlung	58

4.2.6	Reversibilität der statininduzierten Verminderung der Selenoproteinsynthese	59
4.3	Einfluss von Cholesterol und Cholesterolderivaten auf die Selenoproteinexpression	61
4.3.1	Selenoproteinexpression nach Inkubation mit 25-Hydroxycholesterol	61
4.3.2	Selenoproteinexpression nach Inkubation mit LDL	63
4.3.3	Selenoproteinexpression nach Inkubation mit Methyl- β -Cyclodextrin-Cholesterol	65
4.3.4	Quantitative real-time RT-PCR nach Inkubation mit LDL-Cholesterol, 25-Hydroxycholesterol, MCD-Cholesterol	66
4.3.5	Experimente in humanen Fibroblasten	68
4.4	Untersuchungen in transgenen Mausmodellen der Hypercholesterolämie	69
5	Diskussion	73
5.1	Statine sind potente Hemmstoffe der Selenoproteinsynthese	73
5.2	Die klinischen Nebenwirkungen der Statine auf Leber und Muskulatur werden wahrscheinlich durch eine Blockade der Selenoproteinsynthese ausgelöst	76
5.3	Cholesterol wirkt in ähnlicher Weise wie Statine inhibitorisch auf die Selenoproteinsynthese	78
5.4	Die vielfältigen negativen Auswirkungen eines erhöhten Cholesterolspiegels erklären sich möglicherweise mit einer daraus resultierenden generalisierten Hemmung der Selenoproteinsynthese	84
6	Zusammenfassung	86
7	Abstract	88
8	Literaturverzeichnis	89
9	Lebenslauf	105
10	Eigene Publikationen	106
11	Abkürzungsverzeichnis	107
12	Danksagung	110

1 Einleitung

1.1 Selen

Selen ist ein essentielles Spurenelement, das von Mensch und Tier mit der Nahrung aufgenommen wird. Dementsprechend ist die Selenaufnahme maßgeblich vom Vorkommen im Boden abhängig. Im Vergleich zu vielen Ländern in Europa gelten die Böden in den USA als sehr selenreich, wodurch Pflanzen und Tiere als gute Selenquelle dienen und eine gute Versorgung mit dem Spurenelement gegeben ist (Rayman 2000). Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung rät zur Aufnahme von 30 – 70 µg Selen pro Tag (µg/d) für Erwachsene, jedoch nicht mehr als 300 µg/d, da diese Konzentration toxisch wirken kann, wenn sie über einen längeren Zeitraum aufgenommen wird (Gasmi et al. 1997; Bleys et al. 2008). Der genaue Hintergrund hierfür liegt noch im Dunkeln, aber es wird vermutet, dass einige Selenverbindungen in der Lage sind, reaktive Sauerstoffspezies zu bilden (Bleys et al. 2008; Drake 2006). Die Selenkonzentration im Plasma sollte zwischen 1 und 2 µM liegen (Swanson et al. 1990). In einigen Teilen von China existieren sehr selenarme Böden, was eine Unterversorgung mit Selen (<10 µg/d) zur Folge hat. Die Auswirkungen können Krankheiten mit schwerwiegenden Konsequenzen sein, wie z.B. die Keshan-Krankheit. Dieses Krankheitsbild zeichnet sich durch eine Kardiomyopathie aus, die nicht selten tödlich verläuft (Li et al. 1985). Tabelle 1.1 zeigt die durchschnittliche Selenkonzentration von in Europa generierten Lebensmitteln.

Die wichtigste Funktion von Selen ist der Einbau in eine bestimmte Proteinklasse, den Selenoproteinen. Es kann jedoch auch unspezifisch als Selenomethionin anstelle von Methionin in Proteine eingebaut werden (Ganther 1999).

Tabelle 1.1. Durchschnittlicher Selengehalt von europäischen Lebensmittelerzeugnissen (Brown and Arthur 2001)

Produkt	mittlere Se-Konzentration in µg/100 g
Früchte	1,0
Milch	1,5
Gemüse	2,0
Brot	4,5
Rind	7,6
Getreide	11,0
Schwein	14,0
Fisch	16,0
Leber	42,0
Niere	145,0

1.2 Selenoproteine

Selen wird von Säugern durch die Nahrung besonders gut als anorganisches Selenit (SeO_3^{2-}) aufgenommen (Burk et al. 1972) und kann in unterschiedlichen Formen vorliegen. Ein Beispiel wäre Selenomethionin, welches bei Selenüberschuss entsteht und anstelle der Aminosäure Methionin in Proteine eingebaut werden kann. In diesem Fall spielt jedoch das Selenatom keine tragende Rolle für das Enzym und kann als Selenspeicher angesehen werden. Bei Selenmangel kann Selenomethionin zu Selenocystein (Sec) abgebaut werden (Burk and Hill 1993). Selenocystein wird auch als die 21. Aminosäure bezeichnet und ist Bestandteil einer bestimmten Proteinklasse, den Selenoproteinen. Alle Selenoproteine besitzen mindestens ein Selenocystein in ihrem aktiven Zentrum, welches entscheidend für die katalytische Aktivität ist. Im Gegensatz zu der Aminosäure Cystein (Cys) ist die Selenolgruppe von Sec bei physiologischem pH weitaus reaktiver als die Thiolgruppe von Cys (Papp et al. 2007). Es konnte in mehreren Tierarten und Zellkulturen gezeigt werden, dass innerhalb der Selenoproteine eine gewisse Hierarchie besteht. So wird bei Selenmangel die Expression einiger Selenoproteine komplett oder zumindest teilweise heruntergefahren, während andere nahezu unbeeinträchtigt bleiben. Ebenso scheinen einige Organe und Gewebe in Bezug auf Selen privilegiert zu sein (Valentine et al. 2005). Bei Selenmangel wird an einigen Orten, wie z.B. im Gehirn, versucht, den Selenstatus und die Selenoproteinkonzentration weitgehend konstant zu halten, während in anderen Zellen Selenoproteine abgebaut werden, um das Spurenelement für erstere Gewebe bereit zu stellen (Behne et al. 1988; Brigelius-Flohé 1999).

Sec besitzt eine einzigartige tRNA mit einem Anticodon komplementär zu UGA, welches normalerweise für den Translationsstopp kodiert. Die Beladung der Selenocystein-tRNA (Sec-tRNA, $\text{tRNA}^{[\text{Ser}]\text{Sec}}$) erfolgt in mehreren Schritten (Xu et al. 2007). Ein möglicher Grund warum Selenocystein nicht direkt auf eine tRNA geladen wird könnte sein, dass Selenocystein nur in sehr geringen Mengen in der Zelle vorliegt. Würde das Level erhöht werden, könnte die Cys-tRNA fälschlicherweise mit Selenocystein anstatt mit Cystein beladen werden, was schließlich zu Missfaltungen und infolge dessen zu veränderten Proteineigenschaften führen könnte (Young and Kaiser 1975; Kramer and Ames 1988).

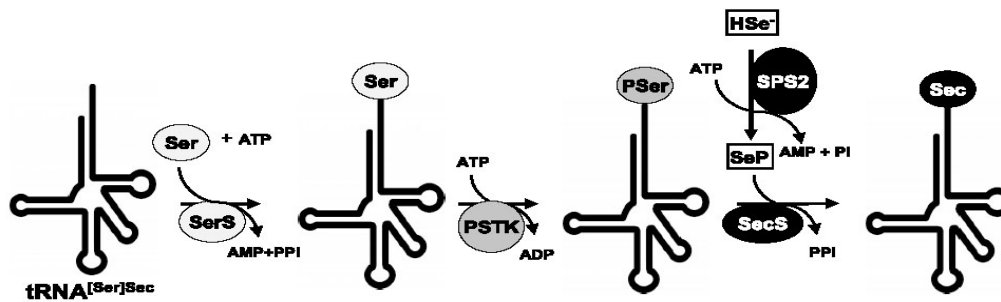


Abb. 1.1: Beladung der Selenocystein-tRNA. Erläuterungen siehe Text (Xu et al. 2007).

Für Selenocystein existiert keine eigene tRNA-Synthetase, weshalb stattdessen im ersten Schritt die tRNA mit einem Serin-Rest durch die Seryl-tRNA Synthetase beladen wird. Der Serin-Rest wird im Anschluss daran phosphoryliert (Carlson et al. 2004), womit es von der Selenocystein-Synthase (SecS) als Substrat erkannt wird. Dieses Enzym vermittelt den Austausch des Phosphorylrestes von Phosphoserin gegen Selenophosphat und setzt dieses gleichzeitig zu Sec um, wodurch die fertige Sec-tRNA (tRNA^{[Ser]Sec}) entsteht (Xu et al. 2007). Selenophosphat, der aktive Selendonator für die Selenocystein-tRNA, wird wiederum durch die Selenophosphat-Synthetase (SPS2), selbst ein Selenoenzym, aus Selenid (Se²⁻) und ATP gebildet (Veres et al. 1994; Ganther 1999). Das ebenfalls in Säugern vorkommende Homolog SPS1 ist wiederum kein Selenoprotein und dient wahrscheinlich zur Aufrechterhaltung der Basallevel von Sec (Allmang and Krol 2006).

Selen kann in organischer oder anorganischer Form vom Menschen aufgenommen und für die Selenoproteinsynthese verwendet werden. Die meisten Pflanzen liefern Selen in Form von Selenomethionin, das unspezifisch in Proteine, z.B. Albumin, eingebaut wird. Tierische Produkte enthalten ebenfalls Selenomethionin, aber auch Selenocystein. Nahrungsergänzungsmittel können beide organische Formen enthalten, oftmals aber auch anorganisches Selenit (Rayman 2000).

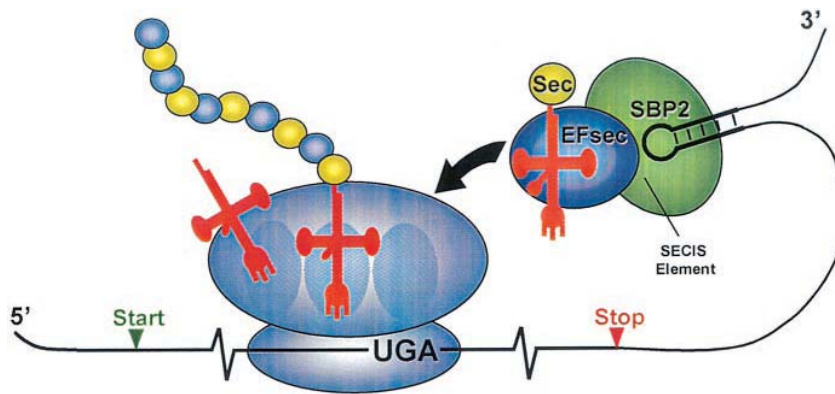


Abb. 1.2: Einbau der Selenocystein-tRNA am UGA-Codon der mRNA. Nach Beladung der tRNA mit Sec folgt die Bindung der tRNA an das SECIS-Element. Das SECIS-Element ist eine Grundvoraussetzung für den Einbau von Selenocystein am UGA-Codon (Hatfield and Gladyshev 2002).

Lange Zeit war unklar welche Faktoren das Ribosom am UGA-Codon zum Einbau von Sec veranlassen anstatt die Translation zu terminieren (Abb. 1.2). Ein augenscheinliches Merkmal der Sec-tRNA sind zwei typische Modifikationen (Abb. 1.3). Zum einen existieren eine methylierte und eine unmethylierte Form der tRNA an Position 34, 5-Methylcarboxymethyluridin-2'-O-methylribose (mcm⁵Um) und 5-Methylcarboxymethyluridin (mcm⁵U). In Zellkulturexperimenten und Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass eine Selen-Supplementation die Menge und Stabilität von Sec-tRNA erhöht. Zudem verschiebt sich das Gleichgewicht Richtung Methylierung. Dies geht mit einer Konformationsänderung einher, welche zu einer erhöhten Stabilität der tRNA führt (Hatfield et al. 1991; Diamond et al. 1993; Jameson et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die Methylierung einen Einfluss auf die Synthese der Selenoproteine hat, welche für den Abbau von oxidativem Stress verantwortlich sind, wie z.B. Glutathionperoxidasen (GPx). Die unmethylierte tRNA-Isoform reguliert die sogenannten Haushalts-Selenoproteine, wie z.B. Thioredoxin-Reduktasen (Carlson et al. 2005; Papp et al. 2007). Haushaltsproteine werden von Genen kodiert, welche in einem relativ konstanten Level exprimiert werden und durch äußere Faktoren kaum beeinflusst werden. Die zweite Basenmodifikation befindet sich an Position 37. An dieser Stelle findet eine post-transkriptionelle Isopentenylisierung der Base Adenosin (i⁶A37) statt. Diese Modifikation gilt als Grundvoraussetzung für die Methylierung der Sec-tRNA an Position 34 (Kim et al. 2000). Bleibt diese aus, hat dies eine verminderte Expression der meisten Selenoproteine zur Folge (Warner et al. 2000; Moustafa et al. 2001). Moustafa et al. konnten in Mäusen, die eine Isopentenyladenosin-defiziente (i⁶A⁻) Sec-tRNA exprimieren, zeigen, dass die Selenoproteinexpression auf translationaler Ebene sinkt, und zwar abhängig vom Protein und Gewebetyp (Moustafa et al. 2001). Andererseits hat eine

Überexpression von wildtypischer Sec-tRNA keine Konsequenzen für die Selenoproteinsynthese (Moustafa et al. 1998).

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 Selenoprotein P (SeP) bei Selenmangel sinken, vermutlich aufgrund einer geringeren Stabilität der mRNA (Christensen and Burgener 1992; Hill et al. 1996).

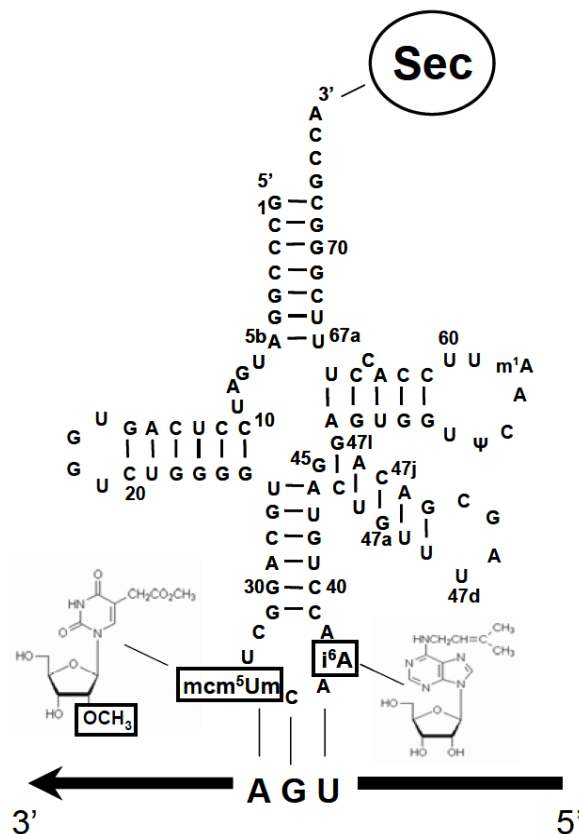


Abb. 1.3: Die Selenocystein-tRNA. Besonders zu beachten sind die Modifikationen an U34 und A37. Erläuterungen siehe Text (Yoo et al. 2009).

Außer einer spezifischen tRNA erfordert der Einbau von Sec am UGA-Codon zusätzlich eine bestimmte RNA-Struktur, das SECIS (SElenoCysteine Insertion Sequence) Element. Diese befindet sich bei Eukaryonten in der 3'-untranslatierten Region der mRNA, zum Teil einige Kilobasen vom UGA-Codon entfernt. SECIS-Elemente haben zwar relativ wenig Sequenzhomologien, sind aber in ihrer Sekundärstruktur stark konserviert (Krol 2002; Lambert et al. 2002; Papp et al. 2007). Diese RNA-Struktur scheint während der Translation mit SBP2 (SECIS-binding protein) zu interagieren. Für die Selenoproteinexpression werden weiterhin ein spezieller Translations-Elongations Faktor, EFsec, und wahrscheinlich noch weitere Proteine benötigt, die jedoch noch nicht alle identifiziert wurden. Obwohl inzwischen

so viele Schlüsselkomponenten für den Sec-Einbau bekannt sind, bleibt der genaue Mechanismus am Ribosom bis heute unklar (Allmang and Krol 2006).

Besonders interessant ist die post-transkriptionelle Modifikation der Selenocystein-tRNA an Position A37, da dies möglicherweise die Selenoproteinsynthese mit dem Cholesterol-Biosynthesepfad verknüpft. Es konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen dieser Modifikation in Form einer Isopentenylisierung in einer reduzierten Selenoproteinexpression resultiert (Warner et al. 2000). Das Anhängen eines Isopentenylrestes an A37 der Sec-tRNA geschieht enzymatisch durch die tRNA-Isopentenyltransferase, in Hefen auch bekannt als MOD5. Isopentenylpyrophosphat entsteht als Zwischenprodukt bei der Cholesterolbiosynthese im Mevalonatweg.

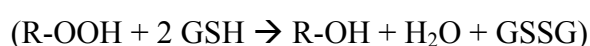
Bislang konnten im Menschen 25 Selenoproteine identifiziert werden, jedoch ist über die Funktion von einigen wenig bekannt. Das humane Selenoproteom besteht aus 17 Familien, von denen einige mehrere Gene umschließen. Diese umfassen die Glutathionperoxidasen (GPx) mit 5 Genen, die Thioredoxin-Reduktasen (TRxR) mit 3 Genen und die Iodothyronin Deiodinasen (DIO) mit 3 Genen. Weitere Selenoproteine sind die oben bereits erwähnte Selenophosphatsynthetase 2 (SPS2) und ein 15 kDa Selenoprotein (Sep15). Die restlichen Sec-haltigen Proteine wurden alphabetisch nummeriert, SelH, SelI, SelK, SelM, SelN, SelO, SelP, SelR, SelS, SelT, SelV und SelW (Gromer et al. 2005).

Es existieren verschiedene Mausmodelle, die die Wichtigkeit der Selenoproteine für die Entwicklung und den Stoffwechsel verdeutlichen (Carlson et al. 2009). Ein kompletter Knockout des Sec-tRNA-Gens ist embryonal letal. Es wurden jedoch verschiedene mutante Transgene und konditionelle Knockouts entwickelt, die zu einer verminderten Expression bestimmter Selenoproteine im entsprechenden Gewebe führten (Kumaraswamy et al. 2003). Dies hatte in den untersuchten Modellen zum Teil großen Einfluss auf das Herz-Kreislaufsystem, Muskelfunktion, Fertilität oder Krankheiten wie Krebs, AIDS und das Immunsystem.

Einige der wichtigsten Selenoproteine sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

1.2.1 Glutathionperoxidasen

Im Menschen existieren 7 Isoformen dieses Proteins (GPx1-7), wobei jedoch GPx5 und GPx7 keine Selenoproteine sind. Die Aufgabe der GPx ist die Reduktion von verschiedenen Peroxiden zu den entsprechenden Alkoholen unter Verwendung von Glutathion (Brigelius-Flohé 1999; Atanasova et al. 2006; Margis et al. 2008).



Dabei wird die im aktiven Zentrum des Proteins liegende Selenol-Gruppe, die bei physiologischem pH ionisiert vorliegt (GPx-Se^-), durch das Peroxid oxidiert (GPx-SeOH). Direkt im Anschluss reagiert das oxidierte Enzym mit einer Thiol-Gruppe, vorzugsweise mit reduziertem Glutathion, (GPx-Se-SG). Der letzte Schritt beinhaltet die Regeneration des reduzierten Enzyms durch ein weiteres Glutathion (GPx-SeH). Das oxidierte Glutathion (GSSG) wird in einer zweiten NADPH-abhängigen Reaktion recycled. Dabei entstehen zwei monomere Glutathion (GSH), katalysiert durch die Glutathionreduktase (GSH-R). Dadurch werden Peroxide detoxifiziert und somit zellschädigender oxidativer Stress verringert (Gromer et al. 2005; Papp et al. 2007).

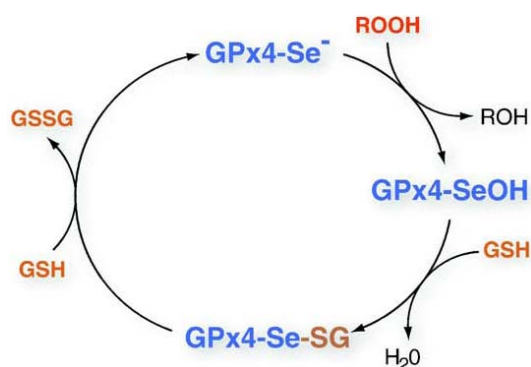


Abb. 1.4. Reaktionsmechanismus der Glutathionperoxidase. Erläuterungen siehe Text (Conrad 2009).

GPx1 ist ein ubiquitäres zytosolisches Homotetramer, das vor allem in der Leber und in Erythrozyten vorkommt. Aufgrund seines Vorkommens wird es auch als cGPx (cytosolic GPx) bezeichnet. Jede Untereinheit besitzt ein Selenocystein und ein Molekulargewicht von ca. 22 kDa. Ein Knockout dieses Proteins zeigt in Mäusen unter normalen Bedingungen keinen sichtbaren Phänotyp. Werden die Mäuse jedoch mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) behandelt, erhöht sich der oxidative Stress enorm, und es zeigen sich ernsthafte Pathologien (de Haan et al. 1998; Fu et al. 1999). Desweiteren führt ein Knockout dieses Proteins zu einer verminderten Proliferationsrate und verstärkter Apoptose in murinen Myoblasten (Lee et al. 2006). GPx1 ist stark selenabhängig. Schon bei leichter Selen-Defizienz wird die Expression herabgesetzt (Bermano et al. 1995; Saito et al. 2003; Novoselov et al. 2005), hauptsächlich aufgrund des verringerten Gehalts an zytoplasmatischer mRNA (Moriarty et al. 1998). In diesem Fall wird der sog. nonsense-mediated decay (NMD) begünstigt, d.h. das UGA Codon in der mRNA wird als Stoppcodon gelesen und die mRNA abgebaut.

In den letzten Jahren wurde aufgrund der antioxidativen Eigenschaften der GPx1 der Zusammenhang zwischen diesem Protein und kardiovaskulären Krankheiten untersucht. In einer Patienten-Studie mit koronaren Krankheiten konnte ein inverser Zusammenhang

zwischen hohem GPx1-Niveau und kardiovaskulären Krankheiten bestätigt werden (Blankenberg et al. 2003; Schnabel et al. 2005; Espinola-Klein et al. 2007). Somit könnte die GPx1-Expression als Biomarker für das Risiko einer Herz-Kreislauf-Erkrankung dienen. Dieser Zusammenhang konnte jedoch in GPx1-Knockout Mäusen nicht bestätigt werden. Die Mäuse entwickelten trotz einer stark fetthaltigen Diät keine ausgeprägteren arteriosklerotischen Läsionen als Wildtyp-Mäuse. Jedoch konnte bei den wildtyp-Mäusen ein starker Anstieg an GPx1 mRNA bei dieser Diät detektiert werden (de Haan et al. 2006).

Eine weitere GPx-Variante ist GPx2. Über dieses Protein ist weniger bekannt. Es ist in der Leber und im Gastrointestinaltrakt zu finden, weshalb es oft auch als GI-GPx bezeichnet wird. In der Niere und im Herz wird es nicht exprimiert (Gromer et al. 2005). Ebenso wie GPx1 handelt es sich hierbei um ein Homotetramer, jedoch ist die Expression weniger seleninduzierbar (Wingler et al. 1999). Knockout-Mäuse sind lebensfähig und entwickeln sich normal (Papp et al. 2007).

GPx3 ist ein glycosyliertes Protein, das in extrazelluläre Kompartimente sekretiert wird. Da es hauptsächlich im Plasma zu finden ist, wird es auch als pGPx (Plasma-GPx) bezeichnet (Tham et al. 1998; Brigelius-Flohé 1999). Die GPx3 ist ebenfalls ein Homotetramer.

GPx4 unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht von den bisher erwähnten Glutathionperoxidasen (Savaskan et al. 2007). Dieses Protein ist ein 19-22 kDa Monomer, und ein Knockout ist embryonal letal. Obwohl im Humangenom nur ein einziges GPx4-Gen vorhanden ist, existiert sowohl eine zytosolische als auch eine mitochondriale Isoform. Wie diese Isoformen entstehen ist bislang noch nicht ganz aufgeklärt. Es wird vermutet, dass für jede Isoform ein anderer Promotor existiert (Maiorino et al. 2003; Imai et al. 2006). Möglicherweise entstehen diese entweder durch unterschiedliche Initiationsstellen bei der Translation (Met²⁸ oder Met¹) oder durch komplett verschiedene Transkripte (Savaskan et al. 2007). Eine nukleäre Isoform kann ebenfalls durch Transkription eines alternativen Exons generiert werden. Die nukleäre GPx4 enthält eine Arginin-reiche Kernlokalisationssequenz und ist praktisch nur in Spermatozyten zu finden, dort allerdings in sehr großen Mengen (Moreno et al. 2003; Savaskan et al. 2007). Die nukleäre GPx4 ist essentiell für die Reifung von Spermien und damit für die männliche Fertilität (Foresta et al. 2002; Maiorino et al. 2005). Da GPx4 stark selenabhängig ist, führt ein Selenmangel zwangsweise zu einer

verminderten Fruchtbarkeit (Foresta et al. 2002; Gromer et al. 2005; Papp et al. 2007; Schneider et al. 2009).

Ein weiterer Unterschied zu anderen GPx ist die Tatsache, dass GPx4 Phospholipidhydroperoxide reduzieren kann, selbst innerhalb von Lipid-Protein-Aggregaten und scheint deshalb ein universelles Antioxidans für Biomembranen zu sein (Thomas et al. 1990). Aufgrund dieser Substratakzeptanz wird es oft als PH-GPx4 (Phospholipid-GPx) bezeichnet. Zudem benützt es im Gegensatz zu anderen GPx nicht nur Elektronen des Glutathions, sondern auch von Proteinthiolen und anderen Äquivalenten (Imai and Nakagawa 2003), mit Ausnahme von Thioredoxin (Savaskan et al. 2007).

In Tiermodellen konnte ein Zusammenhang zwischen GPx4 und kardiovaskulären Krankheiten gezeigt werden. Mäuse, die die mitochondriale Form der GPx4 überexprimieren, zeigten nach einer 20minütigen Ischämie und anschließender Reperfusion eine eindeutig bessere Verfassung des Herzens, was sich in einer signifikant höheren Rate an Herzkontraktionen, geringeren Zellschädigungen und höheren Stoffwechselrate der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe niederschlug. Zudem konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass die Lipidperoxidation in Mitochondrien geringer war als in Kontrollmäusen (Dabkowski et al. 2008). Die arteriosklerotischen Schädigungen in Apolipoprotein E (ApoE)-defizienten Mäusen, welche normalerweise vermehrt Ablagerungen in den Gefäßwänden aufweisen und somit als Arteriosklerosemodell gelten, konnten durch GPx4 Überexpression verringert werden (Guo et al. 2008).

GPx5 und GPx7 sind keine Selenoproteine. Sie enthalten statt Selenocystein im aktiven Zentrum ein Cystein und sind somit nicht selenabhängig. Allerdings ist ihre Kapazität Peroxide zu reduzieren relativ gering, was wahrscheinlich auf den Austausch von Sec zurückzuführen ist. In Säugern wird GPx5 im Nebenhoden exprimiert und sekretiert. Es wird vermutet, dass es die Spermienmembran bzw. das Akrosom vor Lipidperoxidation schützen soll (Williams et al. 1998; Gromer et al. 2005).

GPx6 wurde bislang nur im Riechepithel und in embryonalen Geweben nachgewiesen. Demnach wird davon ausgegangen, dass dieses Enzym im Zusammenhang mit dem Geruchssinn steht (Gromer et al. 2005).

1.2.2 Thioredoxin-Reduktasen

Thioredoxin-Reduktasen (TRxR) bilden zusammen mit Thioredoxin (Trx) und NADPH das Thioredoxin-System. Dieses System ist eines der wichtigsten Redox-Systeme in allen lebenden Organismen. Ähnlich wie die GPx4 ist es in der Lage, Lipid-Hydroperoxide abzubauen (Björnstedt et al. 1995). TRxR ist ein Homodimer mit je ca. 55 kDa pro Untereinheit und ist in allen höheren Eukaryonten präsent. Bakterien, Pilze, Pflanzen und einzellige Eukaryonten besitzen eine kleinere Variante (ca. 35 kDa), die jedoch kein Selen enthält. Die TRxR in Säugern zeigt in ihrer Struktur und Funktion starke Ähnlichkeit zur Glutathion-Reduktase.

Bislang wurden drei verschiedene TRxR in Säugern entdeckt, die jeweils von drei unterschiedlichen Genen kodiert werden. Dazu zählen die zytosolische TRxR1 und die mitochondriale TRxR2. TRxR3 (Thioredoxin-Glutathion Reduktase) wird hauptsächlich in Spermien exprimiert und kann im Gegensatz zu den beiden anderen Glutathiondisulfid (GSSG) reduzieren. Ihre Funktion ist jedoch noch unklar (Mustacich and Powis 2000; Arnér and Holmgren 2000; Arnér 2009). Es ist bekannt, dass noch eine größere Anzahl an TRxR-Spezies durch alternatives Spleißen existiert (Sun et al. 2001; Miranda-Vizuete and Spyrou 2002). Ein Thioredoxin Knockout in Mäusen zeigte sich als embryonal letal, genauso wie ein Knockout der zytosolischen TRxR1 und der mitochondrialen TRxR2, woraus Rückschlüsse auf die Wichtigkeit dieser Proteine während der Entwicklung gezogen werden können (Matsui et al. 1996). Ein Herz-spezifischer Knockout des TRxR2-Gens verursacht eine Kardiomyopathie, ähnlich der Keshan-Krankheit (Conrad et al. 2004).

Alle TRxR besitzen einen gemeinsamen Reaktionsmechanismus und ein ausgedehntes Substratspektrum. Dazu gehören sowohl kleinere Moleküle wie z.B. DTNB (5,5'-Dithio(bis-2-nitrobenzoesäure)) als auch größere Proteine. Interessanterweise zählen auch einige Selenverbindungen zu den Substraten. Selenit (SeO_3^{2-}) z.B. wird durch TRxR zu Selenid (Se^{2-}) metabolisiert, welches den Selendonor für die Sec-Biosynthese darstellt (Ganter 1999). Zudem kann TRxR direkt Wasserstoffperoxid und Lipidhydroperoxide reduzieren (Björnstedt et al. 1995) (s. Abb. 1.5).

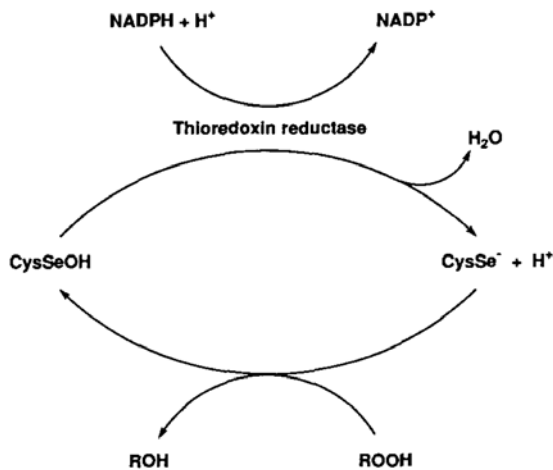


Abb. 1.5: Reaktionsmechanismus der TRxR. Erläuterungen siehe Text (Björnstedt et al. 1995).

Für die katalytische Aktivität der TRxR ist eine intakte Quartärstruktur essentiell. Beide Untereinheiten benötigen ein Selenocystein als vorletzte Aminosäure am jeweiligen C-Terminus, ebenso wie ein enzymgebundenes FAD, das im ersten Reaktionsschritt von NADPH reduziert wird. Die beiden Untereinheiten sind in einer Kopf-Schwanz-Konfiguration miteinander verknüpft. Der Reaktionsmechanismus ist in Abb. 1.6 zu sehen. FADH_2 überträgt seine Elektronen auf eine Disulfidbrücke am N-Terminus seiner eigenen Untereinheit und diese reduziert im Anschluss die Selenylsulfidbrücke am C-Terminus der zweiten Untereinheit. Somit entsteht ein Selenol, das bei physiologischem pH ionisiert wird. Auf diese Weise wird ein aktives Zentrum geschaffen das äußerst reaktiv ist. Durch weitere Reduktion des Enzyms ist es schließlich in der Lage, potentielle Substrate, wie z.B. Trx, zu reduzieren (Arnér 2009). Im reduzierten Zustand kann Trx seinerseits als Elektronendonator fungieren.

Thioredoxine (Trx) zählen zu den Oxidoreduktasen und haben die Aufgabe andere Proteine zu reduzieren. Sie werden ubiquitär exprimiert, ein Knockout ist in Säugern embryonal letal (Matsui et al. 1996). Trx übernehmen wichtige Funktionen in der Verteidigung gegenüber oxidativem Stress und werden deshalb auch als Antioxidantien angesehen (Arnér and Holmgren 2000). Klassische Substrate der Trx sind unter anderem die Ribonukleotidreduktase, die Desoxyribonukleotide für die DNA-Replikation bereit stellt, Peroxidasen und die Thioredoxinreduktasen (Holmgren 1989).

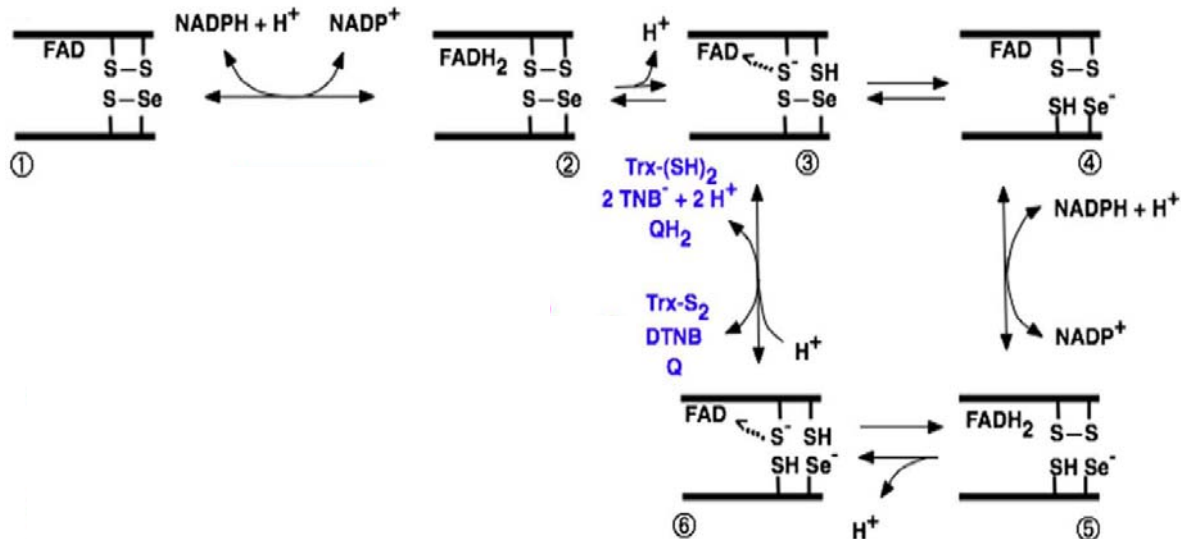


Abb. 1.6: Reaktionszyklus der TRxR. Das oxidierte Enzym wird durch NADPH reduziert (2). Dadurch entstehen drei Formen des Enzyms, die miteinander im Gleichgewicht stehen (2-4). FADH₂ überträgt seine Elektronen auf die Disulfidbrücke seiner eigenen Untereinheit (3) und anschließend auf die Selenylsulfidgruppe am C-Terminus der anderen Untereinheit (4). Das Enzym kann durch ein weiteres Äquivalent NADPH weiter reduziert werden (5). Durch erneute Übertragung der Elektronen von FADH₂ auf die Disulfidbrücke entsteht das aktive Enzym (6), welches in der Lage ist seine Substrate zu reduzieren. Beispiele für Substrate (blau) sind oxidiertes Thioredoxin (Trx), Ellman's Reagenz (DTNB) oder Chinone (Q) (Arnér 2009).

Die meisten Transkripte die vom TRxR1-Gen ausgehen haben einen Promotor, der die typischen Charakteristika eines Haushaltsgens aufweist. Es existieren jedoch auch alternative Promotoren für andere Transkripte dieses Gens. Die Regulation der Transkription ist äußerst komplex und die molekularen Mechanismen für die Expression der verschiedenen Isoformen und deren Funktion sind bis heute weitgehend unbekannt (Arnér 2009). Furman et al. konnten zeigen, dass oxidiertes Low-Density Lipoprotein (LDL) in Makrophagen den Promotor von TRxR1 induziert und somit dieses Protein in arteriosklerotischen Plaques verstärkt exprimiert wird (Furman et al. 2004).

Über die Regulation der Transkription des TRxR2-Gens ist noch weniger bekannt. Bislang wurde noch kein Promotor charakterisiert, der für die TRxR2-Expression verantwortlich ist (Arnér 2009).

1.2.3 Selenoprotein P

Selenoprotein P (SeP) ist ein sekretorisches Protein und repräsentiert das Haupt-Selenoprotein im Plasma, obwohl es in fast allen Geweben, vor allem aber in der Leber, exprimiert wird. Es wird in glycosylierter Form sekretiert und von Zielzellen über einen

Rezeptor-vermittelten Mechanismus aufgenommen (Akesson et al. 1994; Burk and Hill 1994). Man vermutet, dass die Hauptaufgabe von Selp die Speicherung von Selen und dessen Transport ist (Motsenbocker and Tappel 1982; Saito and Takahashi 2002). Das Gehirn ist besonders stark auf einen geregelten Selenstoffwechsel angewiesen. Ebenso ist Selen essentiell für die Spermatogenese. Das gespeicherte Selen kann auf diese Weise über den Blutkreislauf zu bedürftigen Geweben transportiert und dann recycelt werden. Durch die Speicherung von Selen in Form von Selp ist auch gewährleistet, dass keine toxischen Selenkomponenten, wie z.B. Selenit oder freies Selenocystein, vorliegen. Weiterhin scheint es durch seine Redoxeigenschaften als Antioxidans zu wirken. So ist Selp in der Lage, die Oxidation von LDL zu inhibieren (Traulsen et al. 2004) und schützt vaskuläre Epithelzellen vor oxidativem Stress (Hara et al. 2001). Dadurch könnte Selp eine protektive Rolle bei kardiovaskulären Krankheiten haben.

Im Gegensatz zu allen anderen Selenoproteinen besitzt Selp mehr als ein Sec-Rest. Das humane Selp enthält 10 Sec-Reste, das Zebrafisch-Homolog sogar 17 (Ma et al. 2002; Burk and Hill 2005). Allerdings konnte in Ratten gezeigt werden, dass drei weitere, verkürzte Selp Isoformen existieren, die von der gleichen mRNA herrühren und weniger Sec enthalten (Ma et al. 2002). Es gibt Hinweise darauf, dass im Menschen ebenfalls Isoformen existieren, diese wurden jedoch noch nicht isoliert und charakterisiert (Burk and Hill 2009). Es ist bekannt, dass die Selp mRNA zwei SECIS-Elemente besitzt, die den Einbau von Sec gewährleisten (Burk and Hill 1994).

Selp-Knockout-Mäuse sind nicht letal und entwickeln sich bis zu einem Alter von drei Wochen normal. Anschließend treten sporadische Todesfälle auf, oder sie zeigen Symptome wie neurologische Defekte, Wachstumsstörungen oder männliche Infertilität. Interessanterweise konnten die Symptome jedoch durch eine Selen-Supplementation vermieden werden (Schomburg et al. 2003).

1.3 Cholesterolmetabolismus

Der Selenstoffwechsel scheint über zwei Merkmale mit dem Cholesterolstoffwechsel verknüpft zu sein. Zum einen konnte 2007 ein Rezeptor identifiziert werden, der im Gehirn und in Testes für die Aufnahme von Selp verantwortlich ist. Dieser Rezeptor, Apolipoprotein E Rezeptor-2 (ApoER2), wird fast ausschließlich in diesen beiden Geweben exprimiert (Kim et al. 1996). Ein Knockout dieses Rezeptors führte in Mäusen zu Selenmangel in diesen Geweben und damit verbunden zu neuronalen Schädigungen und Infertilität (Olson et al.

2007), besonders wenn zudem eine selendefiziente Diät gefüttert wurde (Burk et al. 2007; Valentine et al. 2008). Die Selenlevel in Leber, Niere, Muskel blieben jedoch unbeeinträchtigt (Burk et al. 2007). Apolipoproteine stellen den Proteinanteil von Lipoproteinen dar, der Transportform von Fetten durch den Organismus. Die Lipoproteine werden anhand ihres gebundenen Apolipoproteins erkannt und von Rezeptoren auf der Zelloberfläche aufgenommen. Die Aufnahme eines Selenoproteins durch solch einen Rezeptor stellt eine Besonderheit dar, deren funktionelle Bedeutung bislang noch unbekannt ist.

Der zweite Zusammenhang zwischen dem Selen- und Cholesterolfstoffwechsel stellt der Mevalonatpfad dar, welcher für die Biosynthese von Cholesterol verantwortlich ist. Dieser Stoffwechselpfad liefert ein Zwischenprodukt, das im Zusammenhang mit der Selenocystein-tRNA steht. Ob Inhibitoren des Mevalonatpfades, wie z.B. Statine die zur Senkung des Cholesterolspiegels eingesetzt werden, ebenso Einfluss auf die Selenoproteinexpression haben, wurde bisher noch nicht ausreichend untersucht.

1.3.1 Mevalonatpfad

Wie bereits oben beschrieben, erfährt die Sec-tRNA eine post-transkriptionelle Modifikation, die Isopentenylisierung am Adenosin 37 (i^6A37). Die hierfür notwendigen Isopreneinheiten entstehen während der Cholesterol-Biosynthese im Mevalonatpfad (Abb. 1.7).

Cholesterol spielt im menschlichen Organismus eine große Rolle. So ist dieses Molekül z.B. essentieller Bestandteil biologischer Membranen und von Lipoproteinen. Die Konsistenz der Zellmembran ist entscheidend für die Funktion der in ihr eingebetteten Proteine. Die Menge an Cholesterol, die in der Membran vorhanden ist, beeinflusst die Konsistenz der Membran, da mit zunehmendem Cholesterolgehalt die Fluidität der Membran sinkt. Das hat Konsequenzen für die Membranproteine, die durch die veränderte Membranzusammensetzung in ihrer Funktion beeinträchtigt sind (Bastiaanse et al. 1997). Ein kleiner Teil des Cholesterols (ca. 1/3) wird mit der Nahrung aufgenommen, hauptsächlich über tierische Fette. Da dieses jedoch nicht vollständig resorbiert wird, kommt der Eigensynthese die größte Bedeutung zu (ca. 2/3). Es existieren jedoch signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies. So ist z.B. der Cholesterol-Turnover in der Maus sowohl qualitativ als auch quantitativ verschieden von anderen Tierarten, besonders im Vergleich mit Primaten. Verglichen mit einem Menschen hat eine Maus eine 16-fach höhere Cholesterolfbiosyntheserate (Dietschy and Turley 2002).

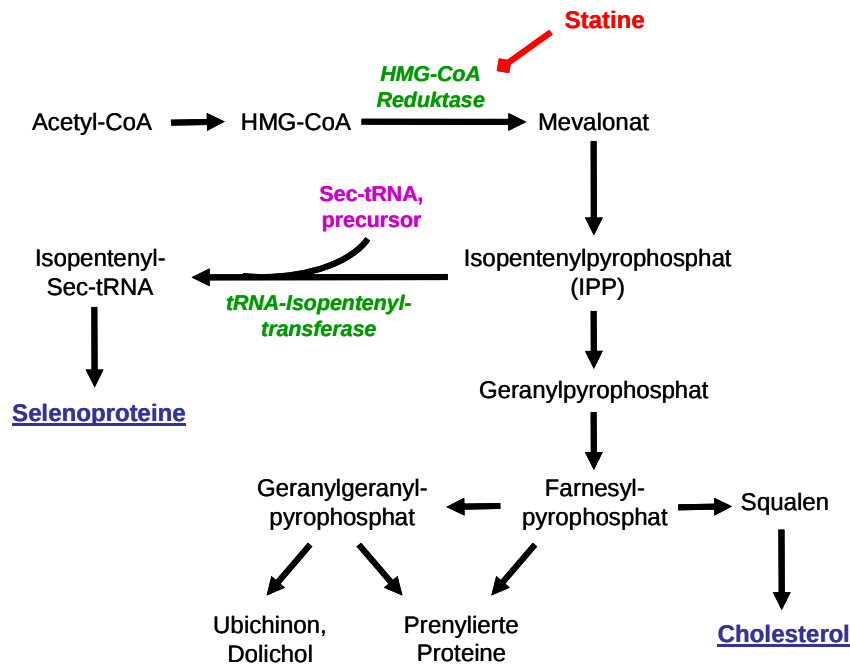


Abb. 1.7: Der Mevalonat-Weg. Ausgehend von Acetyl-CoA wird in diesem Stoffwechselweg Cholesterol synthetisiert. Die Regulation erfolgt hier hauptsächlich durch die HMG-CoA-Reduktase, die unter anderem durch Statine gehemmt werden kann. Der Mevalonat-Pfad liefert außer Cholesterol auch andere Produkte, wie z.B. Ubichinon oder Produkte für die Prenylierung von Proteinen. Ein weiteres Zwischenprodukt (IPP) wird für die Isopentenylisierung der Sec-tRNA benötigt. Die Modifikation dieser tRNA ist Bestandteil der Selenoproteinsynthese.

Die Cholesterol-Biosynthese erfolgt im Mevalonatpfad ausgehend von Acetyl-CoA im ER. Außer Cholesterol liefert dieser Stoffwechselweg noch weitere wichtige Zwischenprodukte wie Isoprenoide. Diese können z.B. als Membrananker von Proteinen fungieren, zur Synthese von Ubichinon (Coenzym Q, CoQ) herangezogen werden oder zur Modifikation der Sec-tRNA dienen (Moosmann and Behl 2004b).

Im Mevalonat-Stoffwechsel nimmt die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase, HMGCR) eine Schlüsselposition ein (Endo et al. 1977). Sie katalysiert unter Verwendung von NADPH die Umsetzung von 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) zu Mevalonat und wird durch verschiedene Mechanismen reguliert. Die Regulation findet sowohl auf transkriptioneller- als auch auf translationeller Ebene statt. Einige Sterole stimulieren sogar den Abbau von HMGCR durch das Proteasom (Goldstein and Brown 1990; Espenshade and Hughes 2007).

Neben seiner Funktion in Membranen ist Cholesterol auch Ausgangsverbindung für die Synthese von Steroidhormonen und Gallensäuren. Cholesterol wird ständig aus der Zelle ausgeschleust, bzw. von ihr aufgenommen. Die Aufnahme erfolgt zum Großteil über

rezeptorvermittelte Endocytose von Lipoproteinen geringer Dichte (Low-Density Lipoprotein, LDL). Die in LDL enthaltenen Cholesterolester werden in den Lysosomen hydrolysiert. Das unveresterte Cholesterol wird recycelt und entweder zurück zur Plasmamembran geschleust oder zum ER transportiert. Dort kann es erneut verestert und anschließend innerhalb vieler Zellen als Lipid-Tröpfchen gespeichert werden (Simons and Ikonen 2000). Die Veresterung übernimmt die Acyl-CoA-Cholesterol-Transferase (ACAT).

Die Cholesterolbiosynthese und die rezeptorvermittelte Aufnahme von LDL werden auf transkriptioneller Ebene durch negative Rückkopplung kontrolliert (Engelking et al. 2005; Goldstein et al. 2006; Espenshade and Hughes 2007). Bei Bedarf an Cholesterol bindet der membrangebundene Transkriptionsfaktor Sterol-Regulatory-Element-Binding-Protein (SREBP) an eine bestimmte DNA-Sequenz, das Sterol-Regulatory-Element (SRE) (s. Abb. 1.8). Neu synthetisierte SREBPs befinden sich in der ER-Membran und sind C-terminal an SREBP-Cleavage-Activating-Protein (SCAP) gebunden. Ist der Sterolbedarf in der Zelle gedeckt, wird der SREBP-SCAP-Komplex durch ein weiteres Transmembranprotein, genannt Insig, in der ER-Membran gehalten. SCAP stellt einen Sterolsensor dar und ist gleichzeitig ein Eskortprotein für SREBP. Sinkt der Sterolgehalt in der Zelle, so geleitet SCAP SREBP vom ER in Vesikeln vom Typ COPII (coat protein II) zum Golgi-Apparat, wo SREBP enzymatisch von 2 Proteasen, Site-1 Protease (S1P) und Site-2 Protease (S2P), prozessiert wird. Der N-Terminus wird abgespalten, wandert in den Zellkern und bindet dort an SRE-Sequenzen von Targetgenen, was eine Hochregulierung der Transkription dieser Proteine zur Folge hat (Horton et al. 2002; Espenshade and Hughes 2007). Zu den Targetgenen gehören unter anderem die HMG-CoA Reduktase (HMGCR) und der LDL-Rezeptor (LDL-R).

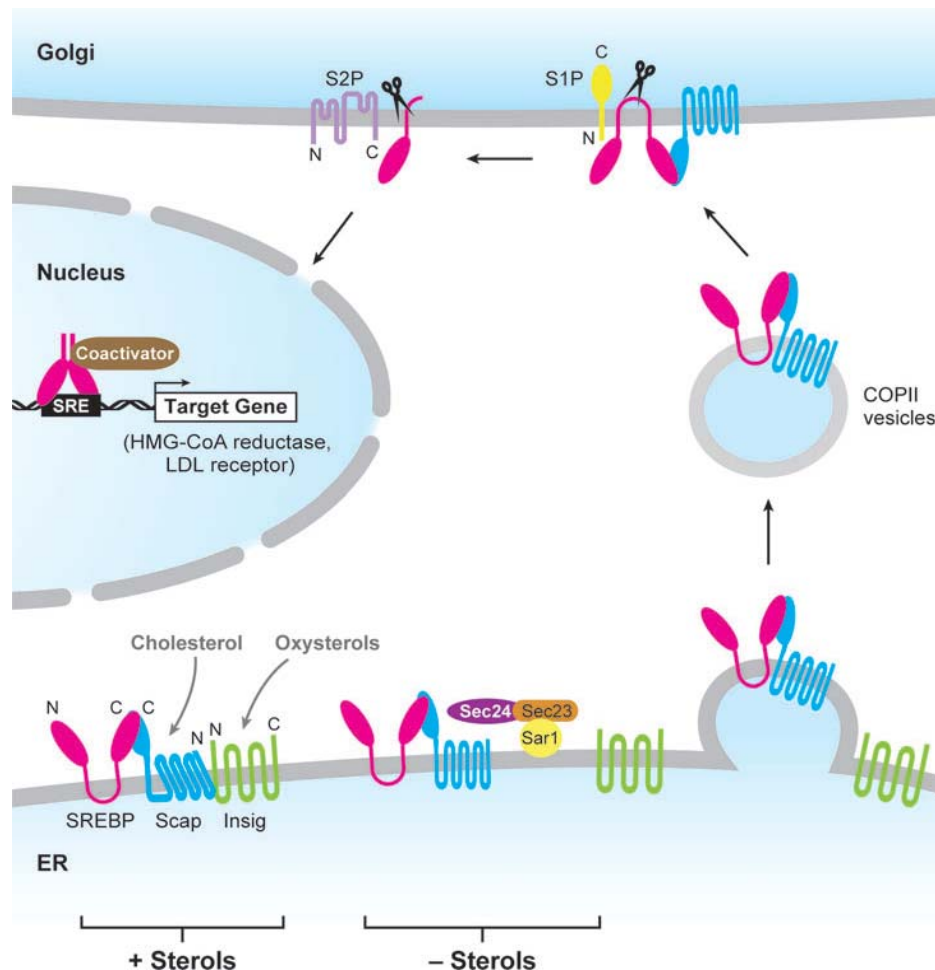


Abb. 1.8: Der SREBP-Pfad . Ist genügend Cholesterole oder Oxysterole in der Zelle vorhanden, so binden diese an Scap bzw. Insig. SREBP bildet mit Scap und Insig einen Komplex und verbleibt in der ER-Membran. Sinkt das Sterolniveau in der Zelle, so löst sich Insig vom Komplex und SREBP-Scap kann durch Interaktion mit „coat-Proteinen“ Sec23/24 und der GTPase Sar1 in COPII-Vesikeln verpackt und zum Golgi transportiert werden. Dort wird SREBP durch zwei Proteasen S1P und S2P geschnitten. Die Transkriptionsfaktor-Domäne wandert in den Zellkern und bindet dort an SRE-Sequenzen in der Promotorregion bestimmter Targetgene (Espenshade and Hughes 2007).

Oxysterole, wie z.B. 25-Hydroxycholesterole (25-HC) können diese Targetgene ebenfalls regulieren, jedoch unterscheidet sich der Mechanismus geringfügig. Statt der Bindung an SCAP interagieren Oxysterole mit Insig, welches daraufhin SCAP bindet und den SCAP-SREBP Komplex in der ER-Membran hält (Adams et al. 2004) (s. Abb. 1.8). Der Nettoeffekt ist auch hier die verminderte Expression von Targetproteinen wie die HMGCR und der LDL-Rezeptor (Brown and Goldstein 1975). 25-HC wird in geringem Maße in verschiedenen Zelltypen enzymatisch durch 25-Hydroxylase synthetisiert und kann, im Gegensatz zu Cholesterole, biologische Membranen passieren (Lange et al. 1995). Es kann entweder in LDL-Partikel eingebaut werden, oder zu Sterolen und Gallensäure metabolisiert werden

(Schroepfer 2000). 25-HC gilt als einer der stärksten Inhibitoren der Cholesterolsynthese, potenter als Cholesterol selbst, und wurde in der Vergangenheit oft dazu verwendet, Sterolsensitive Gene aufzuspüren (Björkhem 2002).

1.3.2 Lipoproteine

Lipoproteine stellen die Transportform des Cholesterols dar (Daniels et al. 2009). Diese bestehen im Wesentlichen aus Cholesterolestern und Triglyceriden, umgeben von Phospholipiden und unverestertertem Cholesterol. Ein weiterer wichtiger Bestandteil ist ein Protein, das Apolipoprotein. Lipoproteine werden anhand ihrer Dichte unterschieden (s. Tabelle). Es existieren fünf Klassen, deren Dichte mit steigendem Proteingehalt zunimmt: HDL (high-density lipoprotein; $>1,063$ g/ml), LDL (low-density lipoprotein; $1,019-1,063$ g/ml), IDL (intermediate-density lipoprotein; $1,006-1,019$ g/ml), VLDL (very-low-density lipoprotein; $0,95-1,006$ g/ml) und Chylomikronen ($<0,95$ g/ml) (s. Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2. Lipoproteine und ihre Zusammensetzung

Name	Dichte (g/ml)	Proteingehalt (%)	Cholesterolgehalt (%)
HDL (High Density Lipoprotein)	$>1,063$	33	30
LDL (Low Density Lipoprotein)	$1,019 - 1,063$	25	50
IDL (Intermediate Density Lipoprotein)	$1,006 - 1,019$	18	29
VLDL (Very Low Density Lipoprotein)	$0,95 - 1,006$	10	22
Chylomikronen	$<0,95$	<2	8

Chylomikronen haben die geringste Dichte und transportieren hauptsächlich Triglyceride. Ihr Cholesterolanteil ist relativ gering. VLDL, IDL und vor allem LDL transportieren hauptsächlich selbst synthetisiertes Cholesterol von der Leber zur Peripherie. Auf ihrem Weg durch die Blutbahn wirken Lipoprotein-Lipasen auf die VLDL-Partikel ein, wodurch diese immer mehr Lipide abgeben und somit erst zu IDL und schließlich zu LDL werden. HDL nimmt Cholesterol vom Gewebe auf und bringt es zurück zur Leber, wo es zu Gallensäuren metabolisiert und letztendlich ausgeschieden wird (Eisenberg 1984).

Lipoproteine werden an der Zelloberfläche von spezifischen Rezeptoren erkannt und ins Zellinnere geschleust (Brown and Goldstein 1979). Alle Rezeptoren dieser Familie sind Transmembran-Glycoproteine mit einer langen extrazellulären und einer vergleichsweise kurzen intrazellulären Domäne. Der LDL-Rezeptor ist der bekannteste Vertreter und Mutationen führen zu familiärer Hypercholesterolämie (FH), was sich in einem Anstieg von LDL-Cholesterol im Plasma zeigt (Daniels et al. 2009; Goldstein and Brown 2009).

Die Rezeptoren erkennen ihre Liganden an deren Apolipoprotein. LDL enthält nur ein einziges Protein, Apolipoprotein B-100 (ApoB-100), HDL enthält unterschiedliche Apolipoprotein A-Varianten (ApoA). LDL bindet an den LDL-Rezeptor an der Zelloberfläche und gelangt mittels Endocytose ins Innere der Zelle (Brown and Goldstein 1979). Der Rezeptor dissoziiert im Endosom von seinem Liganden und gelangt zurück zur Zellmembran. Im Lysosom erfolgt die Degradation des Lipoproteins (Goldstein and Brown 2009). Das LDL-Cholesterol kann anschließend auf verschiedenen Wegen regulieren. Wie bereits oben beschrieben unterdrückt es die Expression der HMGCR und des LDL-Rezeptors über den SREBP-Pfad (Brown and Goldstein 1975) und beschleunigt darüber hinaus auch den Abbau von HMGCR (Gil et al. 1985).

Nach Lehrbuchmeinung sind HDL-Partikel für den reversen Cholesteroltransport verantwortlich. Dieses Lipoprotein nimmt sowohl das im Blut zirkulierende Cholesterol als auch Cholesterol aus nichtheptatischen Zellen auf. HDL bindet an den ABCA1-Rezeptor auf der Zelloberfläche und nimmt Cholesterol und Phospholipide auf. Ein Defekt im ABCA1-Gen führt zur Tangier-Krankheit, was mit einer Anhäufung von Cholesterol in den Zellen verknüpft ist und in einem erhöhten Arterioskleroserisiko resultiert. An der Beladung der HDL-Partikel sind mehrere Proteine beteiligt. Freies Cholesterol wird von der Lecithin:Cholesterol-Acyltransferase (LCAT) oder der Acetyl-CoA-Cholesterol-Acyltransferase (ACAT) verestert und Phospholipide werden durch das Phospholipid-Transferprotein (PLTP) auf HDL übertragen. Auf Leberzellen bindet HDL schließlich an den Scavenger-Rezeptor B1 (SR-B1-R) und wird in seine Bestandteile zerlegt. HDL ist auch in der Lage, Lipide aus Schaumzellen aufzunehmen und gilt daher als anti-arteriosklerotisch (Eisenberg 1984).

1.3.3 Krankheiten die mit dem Cholesterolmetabolismus assoziiert werden

Ein Zusammenhang zwischen erhöhten Cholesterolspiegel und ischämischen Krankheiten wird kontrovers diskutiert. In den 1930er Jahren wurde in zwei unabhängigen Studien zum ersten Mal eine Verbindung zwischen erhöhten Cholesterolspiegel und einem erhöhten Risiko einer Arteriosklerose und deren Folgen festgestellt (Müller 1938, 1939; Thannhauser and Magendantz 1938). In den 1980er Jahren wurde die Hypothese der „Lipoprotein induzierten Arteriosklerose“ von Brown und Goldstein aufgestellt, die speziell das LDL-Cholesterol verantwortlich macht. LDL kann durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) leicht oxidiert werden (Palinski et al. 1989) und wird anschließend über Scavenger-Rezeptoren von Makrophagen phagozytiert. Dadurch entstehen Schaumzellen, welche eine

Entzündungsreaktion in der Arterienwand verursachen. Es bilden sich sogenannte arteriosklerotische Plaques, die die Gefäßwand zunehmend verdicken und den Durchmesser der Arterie dadurch stetig verkleinern (Takahashi et al. 2002). Der ganze Vorgang ist relativ komplex und umfasst unzählige Proteine. Es gibt verschiedene Faktoren, welche das Arterioskleroserisiko erhöhen, darunter Übergewicht, Bluthochdruck, Rauchen und Diabetes. Aber das größte Risiko stellt eine Akkumulation von oxidiertem LDL dar, welches als stark toxisch gilt (Hessler et al. 1983; Luc and Fruchart 1991).

Durch diese Hypothese avancierte das LDL zum „bösen Cholesterol“ und das in den reversen Cholesteroltransport involvierte HDL zum „guten Cholesterol“. Mittlerweile ist diese Rollenverteilung jedoch umstritten und es existieren immer mehr Beweise dafür, dass diese Hypothese so nicht ganz zutreffend sein kann. Es wurde intensive Forschung nach neuen Medikamenten betrieben, die die Lipoproteinkonzentration beeinflussen, genauer gesagt, LDL senken und HDL steigern. Jedoch waren einzig die Statine in der Lage, das Risiko für Arteriosklerose, kardio- oder cerebrovaskuläre Krankheiten und die damit verbundene Sterblichkeit zu verringern. Eine von der Firma Pfizer in Auftrag gegebene Studie über einen CETP-Hemmer (Cholesterylester Transfer Protein) mit der Bezeichnung *Torcetrapib* musste 2006 abgebrochen werden, da es im Verlauf der Studie zu einer erhöhten Sterblichkeit unter den Probanden kam. CETP transferiert Cholesterol von HDL zu LDL oder VLDL und eine Inhibition des Enzyms sollte zu einer Steigerung von HDL und einer Senkung von LDL führen. Das Präparat war zwar in der Lage diese Umverteilung zu generieren, jedoch hatte dies keinen Einfluss auf die Wandstärke der Intima-Media von wichtigen Blutgefäßen und wirkte sich nicht protektiv auf ischämische Krankheiten aus (Nissen et al. 2007). Auch der Cholesterol-Absorptions-Inhibitor *Ezetimib* konnte das LDL-Cholesterol signifikant senken, jedoch hatte dies ebenfalls keine Auswirkung auf die Intima-Media-Dicke (Kastelein et al. 2008). Andere Medikamente, wie der Acetyl-CoA-Cholesterol-Acyltransferase (ACAT)-Inhibitor *Pactimibe*, brachte ebenfalls keinen heilsamen Effekt (Nissen et al. 2006).

Diese und andere Indizien geben Anlass, die Hypothese von „gutem“ und „bösem“ Cholesterol erneut zu überdenken (Colpo 2005). Da Herz-Kreislauf-Erkrankungen in den Industrieländern als Todesursache Nummer eins gilt, existieren unzählige Studien, die sich mit dem Krankheitsbild befassen. Die meisten dieser Studien machen eine Cholesterol-induzierte Gefäßverengung für die Mortalität verantwortlich, obwohl dies bislang noch nicht eindeutig bewiesen ist (Ravnskov 2002; Werkö 2008). Die Tatsache, dass Statine bislang als einziges Medikament zuverlässig präventiv wirksam sind lässt vermuten, dass diese möglicherweise ihre positive Wirkung bei der Verhinderung von ischämischen Krankheiten

nicht durch die Cholesterolsenkung selbst, sondern durch einen Nebeneffekt dieser Substanz vollführt.

1.3.4 Statine

Statine hemmen reversibel und kompetitiv die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase, HMGCR) und sind damit Inhibitoren der Cholesterol-Biosynthese im Mevalonatpfad (Endo et al. 1977). Der Mevalonatpfad ist nicht nur Lieferant von Cholesterol, sondern auch von essentiellen Zwischen- und Nebenprodukten. Ein homozygoter HMGCR-Knockout ist im frühen Embryonalstadium letal und konnte nicht durch Mevalonatsupplementation gerettet werden (Ohashi et al. 2003) .

Zurzeit befinden sich verschiedene Statine auf dem Markt, die bei der Therapie der Hypercholesterolämie zum Einsatz kommen. Durch ihre cholesterolsenkenden Eigenschaften zeigen Statine positive Effekte bei cerebrovaskulären und kardiovaskulären Krankheiten, senken also unter anderem das Risiko von Schlaganfall und koronaren Herzkrankheiten (LaRosa et al. 1999) . Manche Statine besitzen eine mehr als tausendfach höhere Enzymaffinität als HMG, was sie zu äußerst effektiven Inhibitoren macht. Die Reduktion des LDL-Cholesterols liegt dabei zwischen 25-50%. Statine haben auch sog. pleiotrope Effekte, d.h. Statin-induzierte Effekte, die unabhängig von der Cholesterolsenkung auftreten. So können sie z.B. auch Einfluss auf die Genexpression verschiedener Proteine haben. Diese Ergebnisse sprechen für die Wirkung der Statine auf verschiedenen Synthesewegen. Darüber hinaus beeinflussen sie z.B. Prozesse wie Apoptose, neuronales Zellwachstum, Glucose-Homöostase, Zellbeweglichkeit und –differenzierung (Wang et al. 2008). Weiterhin werden Statinen aufgrund ihrer anti-inflammatorischen Wirkung neuroprotektive Eigenschaften nachgesagt (Stüve et al. 2003; van der Most et al. 2009).

Therapeutisch werden Statine entweder als freie Säure (z.B. Atorvastatin und Cerivastatin) oder als Prodrug in Form von Lactonen (z.B. Lovastatin) verabreicht. Die Prodrug-Form wird größtenteils in der Leber zur aktiven Säure metabolisiert. Da die Lactone jedoch eine höhere Lipophilie aufweisen, gelangen sie besser über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn (Corsini et al. 1999; Stark 2003; Vaughan and Gotto 2004). Lovastatin und besonders Atorvastatin werden bei Indikation hypercholesterämischen Patienten verabreicht. Das ca. 20-mal potentere Cerivastatin wurde jedoch wegen starken Nebenwirkungen bereits 2001 vom Markt genommen (Stark 2003). Dieses Produkt, das unter den Namen Lipobay und Baycol vermarktet wurde, erhöhte im Vergleich zu anderen Statinen das Risiko einer Rhabdomyolyse signifikant (Bays 2006).

Das eingenommene Statin gelangt zur Leber wo es die HMGCR bindet und inhibiert, was eine Senkung der Cholesterol-Biosynthese zur Folge hat. Die Abnahme des Leber-Cholesterols hat eine Aktivierung des SREBP-Pfades zur Folge, so dass die Zahl der LDL-Rezeptoren in der Leber und die Menge an HMGCR ansteigen. Das neu synthetisierte HMGCR wird ebenfalls durch das Statin gehemmt und hat somit keinen weiteren Einfluss. Die LDL-Rezeptoren nehmen jedoch LDL aus dem Blutkreislauf auf, um es im Zellinneren zu metabolisieren und das Cholesterol für metabolische Zwecke bereit zu stellen. Somit bleibt der Cholesterolspiegel in der Leber nahezu konstant, während jedoch das LDL-Cholesterol im Blut gesenkt wird. Durch die Spezifität des LDL-Rezeptors wird nur dieses Lipoprotein gebunden, während der HDL-Spiegel konstant bleibt (Stark 2003).

Statine werden im Allgemeinen von den Patienten gut vertragen, obwohl dennoch manchmal unerwünschte Nebenwirkungen auftreten. Im Falle der Statine betreffen diese hauptsächlich Muskel, Leber, Niere und das Nervensystem. Unter anderem sind erhöhte Transaminasen in der Leber eine der üblichen Nebenwirkungen, die bei Statinpatienten auftreten. Diese verlaufen jedoch asymptomatisch und betreffen etwa 0,5–5% aller Patienten, wobei eine klare Dosisabhängigkeit zu erkennen ist (Bays 2006). Etwa 10% der Patienten, die eine hohe Statindosis verabreicht bekommen, zeigen eine Myopathie, die unter Umständen auch den Herzmuskel betreffen kann (Laaksonen et al. 2006; Tsujimoto et al. 2006; Sodha et al. 2008). Der genaue Hintergrund dieser Nebenwirkung ist unbekannt.

Obwohl die Wirkung der Statine schon lange untersucht wird, sind bislang viele Zusammenhänge ungeklärt. Das metabolische Gesamtbild der Statine bleibt weitgehend ungeklärt. Es stellt sich die Frage, ob Statine ihren positiven Einfluss tatsächlich durch die cholesterolsenkende Wirkung zeigen, oder ob eher pleiotrope Effekte dafür verantwortlich sind (Mascitelli et al. 2009).

1.4 Fragestellung

Das Spurenelement Selen ist essentiell für Mensch und Tier und wird für die Expression von Selenoproteinen benötigt. Diese Proteine zeichnen sich durch eine besondere Aminosäure aus, das Selenocystein, welches in diesen Proteinen als katalytischer Faktor wirkt. Die meisten Selenoproteine sind Reduktasen, von denen wiederum die Mehrzahl in den Abbau von oxidativem Stress involviert sind.

Die Regulation der Selenoproteinsynthese ist äußerst komplex, was sich an der strikt hierarchischen Expression dieser Proteine bei steigender Selenverfügbarkeit ablesen lässt.

Darüber hinaus zeigen verschiedene Gewebe eine jeweils eigene, unterschiedliche Hierarchie, mit welcher sie auf Selen-Mangel oder -Verfügbarkeit reagieren.

In überraschender und noch weitgehend unverstandener Weise ist die Expression der Selenoproteine an zwei Kontaktpunkten molekular mit dem Lipidmetabolismus verbunden:

(1) Die post-transkriptionelle Modifikation der Selenocystein-tRNA in Form einer Isopentenylisierung (iA⁶) benötigt Isopreneinheiten, die mutmaßlich im Mevalonatpfad als Zwischenprodukte der Biosynthese von Cholesterol gebildet werden. Wird diese Modifikation der tRNA durch einen Austausch der Base A37 unmöglich gemacht, resultiert dies in einer verminderten Expression von Selenoproteinen (Warner et al. 2000).

(2) Ein weiteres Indiz für einen molekularen Zusammenhang zwischen Selenoproteinen und Cholesterol liefert ein Lipoproteinrezeptor, der Apolipoprotein E Rezeptor-2, der in einigen Geweben für die Aufnahme des Selenoproteins P, der wichtigsten Transportform von Selen im Blut, verantwortlich gemacht werden konnte. In Mäusen führte ein Knockout dieses Rezeptors zu einem Selenmangel, verbunden mit neuronalen Schädigungen und Infertilität (Olson et al. 2007).

Ein Verständnis der funktionellen und molekularen Interaktion des Selen- mit dem Lipidstoffwechsel könnte von großer medizinischer Relevanz sein, da der Lipidstoffwechsel als zentrales Therapieziel bei der Verhinderung der Arteriosklerose und der damit verbundenen Schlaganfälle und Herzerkrankungen gilt. Inhibitoren des Mevalonatpfades, die Statine, gehören mit zu den weltweit am häufigsten verschriebenen Medikamenten und zeigen dennoch viele bis heute unverstandene Effekte im Menschen. Diese könnten zum Teil auf der beschriebenen Interaktion mit der Selenoprotein-Expression beruhen (Moosmann 2004).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die erste dieser molekularen Interaktionen, nämlich die Verbindung des Mevalonatpfades mit der post-transkriptionellen Modifikation der Selenocystein-tRNA und der nachfolgenden Selenoproteinsynthese, näher zu charakterisieren und zu einem funktionellen und medizinischen Verständnis dieser biochemischen Interaktion zu gelangen.

2 Materialien

Alle Standard-Chemikalien, Reagenzien und Kits mit Ausnahme der nachfolgend aufgeführten wurden bei Sigma-Aldrich bestellt. Alle Medien und Reagenzien für die Zellkultur stammten von Invitrogen. Atorvastatin und Cerivastatin wurden bei Synfine bestellt, Lovastatin bei Sigma. Radioaktives ^{75}Se (H_2SeO_3 ; 6×10^{13} Bq/g Se) wurde im Research Reactor Center der Universität von Missouri (MURR) produziert. Der für die Proteinbestimmung verwendete BCA Kit war von der Firma Pierce. Alle Antikörper (Kaninchen-anti-GPx4, Kaninchen-anti-TRxR1 und Maus-anti-Tubulin) wurden bei Abcam bestellt, mit Ausnahme der sekundären HRP-gekoppelten Antikörper (Jackson Immunoresearch). Die chemilumineszenten HRP Substrate (Immobilon Western) waren von Millipore. Zur RNA-Isolierung wurde der Absolutely RNA Miniprep Kit der Firma Stratagene verwendet, zur Herstellung der cDNA der Omniscript Reverse Transkription Kit von Qiagen. SYBR Green Fluorescein Mix sowie die für die real-time PCR verwendeten 96-Well Platten wurden bei Thermo Scientific bestellt. Die PCR-Primer wurden von MWG Operon synthetisiert. Zur Bestimmung des Cholesterols wurde ein Kit der Firma Cayman Chemical Company verwendet. Alle Chemikalien, Reagenzien und Kits wurden nach den Angaben des Herstellers aufbewahrt und verwendet.

2.1 spezielle Chemikalien

Atorvastatin (Calciumsalz)	SynFine, Richmond Hill, Can
Cerivastatin (Natriumsalz)	SynFine, Richmond Hill, Can
Lovastatin (freie Säure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
25-Hydroxycholesterol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LDL (Lipoprotein, human)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LDL (Lipoprotein, human)	Aufreinigung aus Vollblut
Mevalonolacton	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.2 Antikörper

Name	Bezugsquelle	Verdünnung
Kaninchen-anti-Glutathion-Peroxidase 1 (GPx1)	Acris Antibodies, Hiddenhausen	1:1000
Kaninchen-anti-Glutathion-Peroxidase 4 (GPx4)	Acris Antibodies, Hiddenhausen	1:1000
Kaninchen-anti-Thioredoxin-Reduktase 1 (TRxR1)	Acris Antibodies, Hiddenhausen	1:1000
Kaninchen-anti-Selenoprotein P (SeIP)	AG Steinbrenner, Universität Düsseldorf	1:1000
Kaninchen-anti-Aktin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:1000
Kaninchen-anti-Tubulin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:5000
Anti-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, HRP-konjugiert)	Abcam plc, Cambridge, UK	1:10000
Esel-anti-Mouse-HRP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:10000
Ziege-anti-Rabbit-HRP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:10000

2.3 Geräte

Bioimaging Analyzer System BAS-1800	Fuji, Tokyo, Japan
Brutschränke	Binder, Tuttlingen
Dampfsterilisator „VarioClav“	H+P, Oberschleißheim
Geltrockner	BioRad, München
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
iQ Real-Time-PCR Thermozykler	Biorad, München
Luminometer	Wallac Inc., PerkinElmer, USA
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Thermo Labsystems, Ulm
Mini Protean III, Western-Blotting-System	BioRad, München
pH-Meter Qph 70	VWR, Darmstadt
PI-Platte & Cassette	Fuji, Tokyo, Japan
Präparierbesteck	FineScienceTools, Heidelberg
Spektrophotometer	Beckman, München
Szintillationszähler	Perkin Elmer, Waltham, USA
Sterilbänke	Heraeus, Hanau
Trans-Blot-Blottingapparatur	BioRad, München
Ultrazentrifugen-Rotor TLA 120.2 und SW41 Ti	Beckman, München
Ultrazentrifuge Optima TLX	Beckman, München
Vakuum-Konzentrator „Univapo 100H“	Montreal-Biotech Inc., Canada
XCell Sure Lock Western-Blotting-System „NuPAGE“	Invitrogen, Karlsruhe
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich, Tuttlingen

2.4 Weitere Verbrauchsmaterialien

Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
pH-Papier	Merck, Darmstadt
Protran Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturschalen	TPP Europa/Schweiz

2.5 Puffer und Lösungen

Zusammensetzung allgemein verwendeter 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 (NaOH)

10x Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)

0,25 M Tris-Base
1,37 M NaCl
27 mM KCl
pH 7,4 (HCl)

Tris-gepufferte Salzlösung mit TWEEN 20 (TBST)

1x TBS
0,1% (v/v) Tween 20
pH 7,4

1x Lysispuffer (nativ)

0,1 mM Tris-HCl, pH 8
0,1% (v/v) Protease-Inhibitor Cocktail

1x Lysispuffer (nativ)

0,1 mM Tris-HCl, pH 7,4

3x Lysispuffer (denaturierend)

30% (w/v) Succrose
1,2% (w/v) SDS
1 M Tris-HCl, pH 8

Solubilisierungs-Lösung

40% (w/v) Dimethylformamid
10% (w/v) SDS
pH 4,0 (Eisessig)

MES-Puffer

50 mM MES
1 mM Na-EDTA, pH 6,0

MTT-Lösung

5mg/ml MTT in ddH₂O

Zusammensetzung der für die Proteinbiochemie verwendeten Puffer und Lösungen

4x Ladepuffer für die SDS-PAGE

200 mM Tris-HCl, pH 6,8
8% (w/v) SDS
40% (v/v) Glycerol
0,02% (w/v) Bromphenolblau
20% (v/v) β -Mercaptoethanol

10x Laufpuffer für die SDS-PAGE

250 mM Tris-Base
2,5 M Glycin
1% (w/v) SDS
pH 8,3

Trenngel für die SDS-PAGE

0,375 M Tris-HCl, pH 8,8
8%-12% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
0,1% (w/v) SDS
0,05% (v/v) TEMED
0,1% (w/v) APS

Sammelgel für die SDS-PAGE

0,15 M Tris-HCl, pH 6,8
3% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
0,1% (w/v) SDS
0,05% (v/v) TEMED
0,1% (w/v) APS

25x Transferpuffer

300 mM Tris Base
2,4 M Glycin
Addition von 20% (v/v) Methanol bei Herstellung der 1x Verdünnung

1x Ponceau S

0,2% (w/v) Ponceau S
5% (v/v) Essigsäure

Blockierungspuffer

5% (w/v) Trockenmilchpulver in TBST

Coomassie-Färbelösung

0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
50% (v/v) Methanol
10% (v/v) Eisessig

Coomassie-Entfärbelösung

7,5% (v/v) Ethanol
5% (v/v) Essigsäure

2.6 Oligonukleotide

Alle Primer wurden bei Eurofines MWG Operon (Ebersberg) bestellt.

Primer	Sequenz 5'→3'	Product größe (bp)
GPx1 forward	GCA CCC TCT CTT CGC CTT C	207
GPx1 reverse	TCA GGC TCG ATG TCA ATG GTC	
GPx4 forward	CGG GCT ACA ACG TCA AAT TCG	222
GPx4 reverse	GGG GCA GGT CCT TCT CTA TCA	
HMGCR forward	GGA CCC CTT TGC TTA GAT GAA	107
HMGCR reverse	CCA CCA AGA CCT ATT GCT CTG	
HO1 forward	CAG TGC CAC CAA GTT CAA GC	112
HO1 reverse	GTT GAG CAG GAA CGC AGT CTT	
NQO forward	GGT TTG AGC GAG TGT TCA TAG G	129
NQO reverse	GCA GAG AGT ACA TGG AGC CAC	
Tubulin forward	CTG TTC GCT CAG GTC CTT TTG	147
Tubulin reverse	CCT CCT TCC GTA CCA CAT CCA	

2.7 Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden adhärenente klonale Zellen einer humanen Leberzelllinie verwendet (HepG2 (Knowles et al. 1980)). Diese wurden großzügigerweise von Dr. A. Lescure (Centre National de la Recherche Scientifique, Straßburg, Frankreich) bereitgestellt. Weiterhin kamen humane primäre Hautfibroblasten, freundlicherweise von Dr. D. Haas (Universitätsklinikum, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Heidelberg) zur Verfügung gestellt, zum Einsatz.

2.8 Mäuse

Zur Analyse der Selenoproteinexpression im Tiermodell wurden zwei mutante Mausstämme verwendet (The Jackson Laboratory, Maine, USA), bei denen gezielt ein bestimmtes Gen ausgeschaltet worden war. Es wurden jeweils vier Tiere mit einem LDL-Rezeptor-Knockout

(LDL-R^{-/-}, Bestellnr. 2207) und vier Tiere mit einem ApoE-Knockout (ApoE^{-/-}, Bestellnr. 2052) analysiert. Vier Kontroll-Mäuse (C57BL/6, Bestellnr. 664) wurden ebenfalls bei der Firma The Jackson Laboratory, Maine, USA bestellt. Sämtliche Tiere waren männlich und acht Wochen alt ($\pm$ 3d) und warden mit einem standardisierten Futter und Wasser versorgt.

2.9 Lösungen und Medien für die Zellkultur

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

Die Abkürzungen bedeuten: D-PBS, Dulbecco's Phosphate-Buffered Salt Solution; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

Kulturmedium für HepG2-Zellen und Fibroblasten

DMEM (Gibco-#41965)

10% FCS

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

1 mM Pyruvat (Gibco-#11360)

25 nM Na₂SeO₃

Kulturmedium für die Versuchsansätze

Optimem-Pulver (Gibco-#22600-134) (nach Vorschrift angesetzt)

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

20 mM Hepes (Sigma)

Beschichtungslösung für die HepG2-Zellen

0,1 mg/ml Poly-L-Ornithin in Wasser (Gibco-#14190)

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Die klonalen humanen HepG2-Zellen (Knowles et al. 1980) wurden in einem wasserdampfgesättigten Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ gehalten. Zur Erhaltung der Kultur wurde DMEM-Medium mit FCS (10%), Penicillin/Streptomycin (100 U/ml), Pyruvat (1 mM) und 25 nM Natriumselenit (Na₂SeO₃) eingesetzt. Für HepG2-Zellen wurden die Zellkulturplatten zuvor für mindestens 15 min mit Poly-L-Ornithin (1 mg/ml) beschichtet und anschließend mit PBS gewaschen. Das Passagieren der adhärennten Zellen wurde unter Verwendung einer 0,1% (w/v) Trypsin / 0,02% (w/v) EDTA-Lösung durchgeführt.

3.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Zur Unterscheidung lebender und toter Zellen wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl des membranimpermeablen Farbstoffs Trypanblau verdünnt. Die lebenden Zellen schließen den blauen Farbstoff aus und können daher unter dem Mikroskop als helle, doppelbrechende, kugelige Strukturen identifiziert und gezählt werden.

3.3 Behandlung der HepG2-Zellen

Alle Experimente wurden, soweit nicht anders angegeben, in Serum-freiem Optimum-Medium mit Penicillin/Streptomycin (100 U/ml), Hepes (20 mM) und 25 nM Natriumselenit durchgeführt. Sämtliche Zellkulturplatten die für HepG2-Zellen genutzt wurden, wurden zuvor für mindestens 15 min mit Poly-L-Ornithin (1 mg/ml) beschichtet und anschließend mit PBS gewaschen.

Die adhärennten Zellen wurden mittels einer 0,1% (w/v) Trypsin / 0,02% (w/v) EDTA-Lösung von der Kulturplatte gelöst, abzentrifugiert und anschließend in Optimum-Medium resuspendiert bevor die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde. Die HepG2-Zellen wurden mit einer Dichte von $2 \cdot 10^5$ Zellen/Well in jeweils 1 ml Optimum-Medium in einer 12-Well Kulturplatte ausgesät. Am nächsten Tag, nachdem gewährleistet war dass sämtliche Zellen angewachsen waren, wurden diese mit Statinen behandelt.

Sowohl Atorvastatin als auch Cerivastatin und Lovastatin wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in Ethanol gelöst. Daher wurde die unbehandelte Kontrolle in jedem Experiment mit einem äquivalenten Volumen Ethanol (0,1-1%) inkubiert, so dass jedes Well einer Zellkulturplatte der gleichen Konzentration an Ethanol ausgesetzt war. Das zugegebene Volumen an Statin/Ethanol-Lösung betrug maximal 1%.

3.4 Selenabhängigkeit der Selenoproteinexpression

Die Zellen wurden kultiviert und ausgesät wie oben beschrieben (s. Kapitel 3.3) mit der Ausnahme, dass das für dieses Experiment verwendete Optimem-Medium kein zusätzliches Selen enthielt. Nachdem die Zellen über Nacht angewachsen waren, wurden diese am nächsten Tag mit verschiedenen Konzentrationen Selen über 4 d inkubiert. Durch einen im Anschluss durchgeführten Western-Blot (s. Kapitel 3.5-3.8) konnte durch spezifische Antikörper die quantitative Selenabhängigkeit verschiedener Selenoproteine gemessen werden.

3.5 Proteingewinnung und -quantifizierung

Nach 4 d Inkubation wurde das Kulturmedium, welches das sekretorische Selenoprotein P (SeIP) enthielt, abgenommen und mit 5 µl/ml Protease-Inhibitor-Cocktail versetzt. Im Anschluss wurden eventuell vorhandene Zellreste für 2 min abzentrifugiert und das Probenvolumen unter Erwärmen (55°C) im Vakuum auf ca. 100 - 200 µl eingengt.

Die adhärennten Zellen wurden mit 0,5 ml 1x PBS gewaschen, in 250 µl nativem Lysepuffer mit Protease-Inhibitor (s. Kapitel 2.5) geerntet und zur Denaturierung für 15 min bei 95°C erhitzt. Die Proteinquantifizierung erfolgte mittels eines BCA-Kits der Firma Pierce. Dabei reagieren zweiwertige Kupferionen quantitativ mit Proteinen zu einwertigen Kupferionen. Diese geben mit der zugegebenen Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbstoff, dessen Absorption photometrisch ausgewertet werden kann.

Die Proben wurden 1:50 mit Wasser verdünnt und davon jeweils 50 µl mit 200 µl BCA-Reagenz vermischt. Nach 30 min Inkubation bei 60°C wurde die optische Dichte bei 560 nm gemessen. Als Standard dienten verschiedene Konzentrationen an Serumalbumin.

3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer apparenten Masse wurde zunächst ein SDS-haltiges Polyacrylamid-Gel gegossen. Dieses besteht aus zwei Teilen, einem Sammelgel (pH 6,8) mit 4% Polyacrylamid-Gehalt, in dem die Proteine eine Aufkonzentrierung durch einen Stapeleffekt erfahren und einem 10% polyacrylamidhaltigen Trenngel (pH 8,8), in dem die tatsächliche Auftrennung erfolgt.

Zuvor wurden die Proben auf gleichen Proteingehalt normiert, mit 4x Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Der SDS- und β -Mercaptoethanol-haltige Ladepuffer hat dabei die Aufgabe, die Oberflächenladung der Proteine zu maskieren und durch reduktives Erhitzen Disulfidbrücken zu spalten. Zudem enthält der Ladepuffer Glycerin, was bei der Auftragung ein Absinken der Probe in der Geltasche erleichtert. Zur Quantifizierung der Proteinbanden wurde zusätzlich ein Proteinmarker (peqGOLD Protein-Marker IV (Prestained) von PeqLab) mit bekannten Bandengrößen aufgetragen. Durch Anlegung einer Spannung wandern die negativ geladenen denaturierten Proteine im elektrischen Feld in Richtung Anode, wobei das dichte Geflecht aus polymerisiertem Acrylamid ein mechanisches Hindernis darstellt und die Proben somit nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Proteinproben wurden bei 150 Volt in 1x SDS-Laufpuffer in der „Mini-PROTEAN® 3 Cell“ Gel-Kammer der Firma Biorad aufgetrennt.

3.7 Western Blot

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine zur besseren Detektion auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierfür wurde das Wetblot-System „Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell“ von Biorad und ein Methanol-haltiger 1x Transferpuffer verwendet.

Durch Anlegen einer Spannung von 80 V werden die im Gel vorhandenen, negativ geladenen Banden innerhalb von 2 h auf die Nitrozellulosemembran geblottet. Nach dieser Zeit wurde der Transfer durch 5 min Anfärben der Membran mit einer Ponceau S-Lösung und anschließender Waschung mit TBST überprüft. Bei Verwendung von Zellkulturüberständen diente die so sichtbar gemachte Albumin-Bande als Ladekontrolle. Durch längeres Waschen mit TBST ließen sich die durch die Ponceau-Färbung entstandenen roten Banden wieder komplett entfernen.

3.8 Immunologischer Protein-Nachweis auf Western-Blot-Ebene

Zur Vermeidung unspezifischer Bindung des Detektions-Antikörpers an die Membran wurde diese für 30 min bei Raumtemperatur mit 5% fettfreiem Milchpulver in TBST abgesättigt. Der Antikörper wurde zuvor in geeigneter Konzentration (s. Kapitel 2.2) in 5% fettfreiem Milchpulver in TBST, welches zur Konservierung zusätzlich 0,1% Natriumazid enthielt, verdünnt. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die Membranen dreimal für ca. 10 min mit TBST gewaschen und anschließend mit einem sekundären Horseradish-Peroxidase-(HRP)-gekoppelten Antikörper für 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschungen von ca. 10 min und anschließender Zugabe einer Peroxid-Substratlösung erfolgte die Detektion der Peroxidase-abhängigen Chemilumineszenz mittels der digitalen Entwicklermaschine „Las 3000“ von FujiFilm. Als Substratlösung wurde die kommerzielle HRP-Substrat-Lösung der Firma Millipore (Immobilon Western) verwendet. Als Ladekontrolle wurde ein anti-GAPDH-, anti-Tubulin- oder anti-Aktin-Antikörper eingesetzt. Die digitalen Banden konnten mit dem Quantifizierungsprogramm „Aida“ ausgewertet werden.

3.9 Protein-Markierung mit ^{75}Se

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Neusynthese von Selenoproteinen mittels einer radioaktiven Methode gemessen. Alle selenhaltigen Proteine wurden radioaktiv markiert, in dem die kultivierten Zellen mit ^{75}Se in Form von Natriumselenit (H_2SeO_3) inkubiert wurden. Während einer definierten Inkubationszeit von 16 h hatten die Zellen somit die Möglichkeit, dieses radioaktive Isotop zu reduzieren, zu aktivieren und anschließend für die Selenoproteinbiosynthese zu verwenden. Nur die während der definierten Inkubationszeit mit dem radioaktiven Isotop neu entstandenen Selenoprotein werden auf diese Weise quantifizierbar gemacht.

Die Zellen wurden hierzu in 12-Well-Platten ausgesät und behandelt wie oben beschrieben (s. Kapitel 3.3). Die Inkubationszeit mit verschiedenen Konzentrationen an Atorvastatin, Cerivastatin und Lovastatin betrug 4 d. Zum Zeitpunkt 16 h vor dem Ende der Inkubationszeit wurden in jedes Well 37 kBq ^{75}Se pro ml Kulturmedium gegeben. Gleichzeitig wurde unter gleichen Bedingungen ein nicht-radioaktives Parallelexperiment zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen durchgeführt (s. Kapitel 3.5). Die radioaktiv markierten Zellen wurden in Ladepuffer, der zuvor 1:0,5 mit Wasser verdünnt worden war, geerntet und für ca. 15 min auf 95°C erhitzt. Die denaturierten Proben wurden abgekühlt, kurz zentrifugiert und

auf gleiche Proteinkonzentrationen normiert. Die anschließende Auftrennung erfolgte mittels eines 10% SDS-PAGE-Gels (150 V, 2,5 h). Das Gel wurde anschließend mit Coomassie blue-Lösung für ca. 30 min gefärbt, und über Nacht in Coomassie-Entfärber-Lösung entfärbt, bevor es dann im Gel-Trockner bei 65°C für ca. 3,5 h getrocknet wurde. Das gefärbte, getrocknete Gel wurde eingescannt und zur anschließenden Detektion radioaktiver Selenoproteine auf eine Phosphorimager-Platte gelegt. Nach 5 d erfolgte die Auslesung der Platte am „Bioimaging Analyzer System BAS-1800“ (Phosphoimager) der Firma Fuji. Die digitalen Bilder der radioaktiven Banden und des Coomassie-gefärbten Gels konnten mit dem Quantifizierungsprogramm „Aida“ ausgewertet werden.

Als zusätzliche Quantifizierung wurden die Banden des Gels ausgeschnitten, über Nacht bei 45°C in Szintillationsflüssigkeit (Zinsser Analytic) hydratisiert und mit einem Szintillationszähler der Firma Perkin-Elmer analysiert.

3.10 Reversibilitätsexperimente

Um herauszufinden, ob der Einfluss der Statine durch einen Metaboliten des Mevalonatpfades rückgängig gemacht werden kann, wurden Reversibilitätsexperimente durchgeführt. Dabei wurden die Zellen wie oben beschrieben kultiviert und ausgesät (s. Kapitel 3.3). Die Zellen wurden mit 500 nM Cerivastatin inkubiert und gleichzeitig mit Mevalonolacton (1 mM), Geraniol (50 µM), Geranylpyrophosphat (50 µM), Farnesol (10 µM), Farnesolpyrophosphat (50 µM), Geranylgeraniol (50 µM) oder Geranylgeranylpyrophosphat (50 µM) behandelt. Anschließend wurde die Zellen nach 4 d Inkubationszeit radioaktiv mit ⁷⁵Se markiert und die Selenoproteine mittels Phosphoimager detektiert (s. Kapitel 3.9).

3.11 Aktivitätsbestimmung der Glutathion-Peroxidase

Zusätzlich zur Messung des Statineinflusses auf die Expression der Glutathionperoxidase (GPx) wurde die zytosolische Aktivität dieses Enzyms bestimmt. Dabei wurde ein NADPH-abhängiger enzymgekoppelter Assay, gemäß einem Protokoll nach Saito et al., angewandt (Saito et al. 2003).

Die Zellen wurden mit einer Dichte von $4 \cdot 10^5$ Zellen/Well in 2 ml Optimem-Medium in einer 6-Well Kulturplatte ausgesät und am nächsten Tag mit 1 µM Atorvastatin oder 1 µM Cerivastatin inkubiert. Nach 4 d Inkubationszeit wurden die Zellen in 1 ml kaltem nativen Lysepuffer, bestehend aus 0,1 M Tris-HCl, pH 8, (s. Kapitel 2.5) dem zum Schutz vor

Proteindegradation ein Protease-Inhibitor-Cocktail zugegeben worden war, geerntet. Um eine zytosolische Fraktion zu erhalten, wurden die Zellen zunächst für ca. 10 s auf Eis sonifiziert und anschließend bei 105000 g für 1 h bei 4°C in einer Ultrazentrifuge (Optima TLX der Firma Beckmann, Rotor TLA 120.2) zentrifugiert. Der zytosolische Überstand wurde abgenommen und eine Protein-Quantifizierung mittels BCA-Kit (s. Kapitel 3.5) durchgeführt. Zur Messung der GPx-Aktivität wurde in einer Küvette jeweils ein Aliquot der Proben mit 200 μ M NADPH, 2 mM Glutathion (GSH) und 1 U Glutathion-Reduktase (GSH-R) versetzt und mit 0,1 M Tris-HCl auf 1 ml aufgefüllt. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 min bei Raumtemperatur vorinkubiert, um eventuell in der Lösung bereits vorhandene Peroxide abzubauen. Im Anschluss daran wurde die Messung durch Zugabe von 70 μ M tert-Butylhydroperoxid (t-BuOOH) gestartet und die Änderung der NADPH-Konzentration bei 340 nm gemessen.

Die GPx reduziert dabei das t-BuOOH zu einem Alkohol, wobei gleichzeitig aus 2 Molekülen GSH ein Molekül oxidiertes Glutathion (GSSG) entsteht (s. Abb. 3.1). Das oxidierte Glutathion wird sofort von der im Überschuß zugegebenen GSH-R unter Verbrauch von NADPH wieder reduziert und steht somit für einen neuen Reaktionszyklus bereit. Die Oxidation von NADPH zu NADP^+ ist somit proportional zur GPx-Aktivität und kann photometrisch detektiert werden.

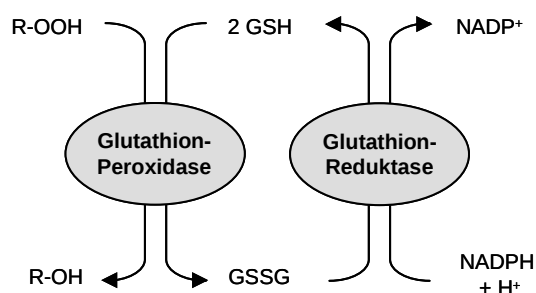


Abb. 3.1: Gekoppelter Enzymassay zur Bestimmung der GPx-Aktivität. Erläuterungen siehe Text. Die GPx-Aktivität ist proportional zur NADPH-Oxidation.

3.12 Glutathion-Quantifizierung

Um zu überprüfen, ob die Statinbehandlung einen Einfluss auf die Gesamt-Glutathionmenge oder deren Redox-Status hat, wurden die zytosolischen Glutathion-Level photometrisch nach einem Protokoll von Griffith erfasst (Griffith 1980). Dazu wurden die in 12-Well Kulturplatten ausgesäten und mit 1 μ M Atorvastatin oder 100 nM Cerivastatin inkubierten HepG2-Zellen mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 200 μ l kaltem MES-Puffer

geerntet. Nach kurzem Sonifizieren (5 s, auf Eis) wurden die Zellen für 15 min bei 10000g und 4°C zentrifugiert. Ein kleines Aliquot des Überstandes (10 µl) wurde für eine Protein-Quantifizierung verwendet (s. Kapitel 3.5), der Niederschlag wurde verworfen. Dem restlichen Überstand wurde ein Volumen Metaphosphorsäure (MPA) zugegeben, um die enthaltenen Proteine und damit die proteinischen Thiol-Gruppen zu fällen. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die gefällten Proteine bei 2000g für 2 min abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt, in dem jeweils 50 µl Probe mit 3,25 µl einer 4 M Triethanolamin-Lösung (TEA) versetzt wurde. Der pH-Wert wurde mit einem Indikatorpapier überprüft. Um die Gesamt-Glutathionkonzentration (GSH + GSSG) zu bestimmen, wurde den Proben 70 µl einer vorbereiteten Reaktionslösung zugegeben, bestehend aus 3 mM NADPH, 6 mM 5,5-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellmans Reagenz) und 50 U/ml Glutathion-Reduktase (GSH-R). Alle Komponenten dieser Reaktionslösung wurden in einem Puffer aus 125 mM Natriumphosphat und 6,3 mM Natrium-EDTA, pH 7,5 gelöst. Nach 10 min Inkubation bei 30°C wurden die Proben photometrisch bei 405 nm am Mikrotiterplatten-Lesegerät erfasst. Dieser Assay beruht darauf, dass reduziertes GSH mit DTNB zu dem stark chromogenen Thiol-Produkt 2-Nitro-5-thiobenzoessäure (TNB) reagiert, welches bei 405 nm detektiert werden kann (s. Abb. 3.2). Das dabei oxidierte GSSG wird durch die im Reaktionspuffer enthaltene NADPH-abhängige GSH-R schnell zu GSH reduziert, welches damit für den nächsten Reaktionszyklus bereitgestellt wird.

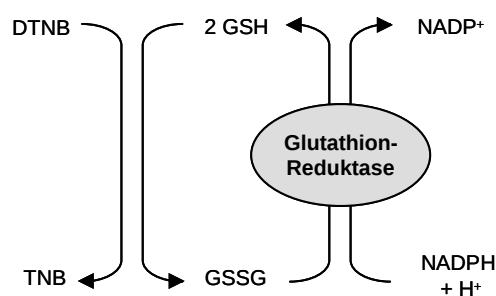


Abb. 3.2.: Reaktionszyklus zur Bestimmung des Gesamt-Glutathions (GSSG+GSH). Erläuterungen siehe Text.

Mit Hilfe eines alkylierenden Reagenz ist es möglich nur das oxidierte Glutathion separat zu erfassen. Dabei wurde ein paralleler Versuchsansatz vor Zugabe des DTNB-Reaktionsgemisches mit 1 M Vinylpyridin versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Vinylpyridin reagiert mit dem im Ansatz enthaltenen reduzierten GSH, so dass als Konsequenz daraus in dieser Messung ausschließlich oxidiertes GSSG erfasst wird.

Über eine Standardreihe bestehend aus verschiedenen GSSG-Konzentrationen konnten die in den Proben enthaltenen GSSG-Konzentrationen ermittelt, aber auch die Gesamt-Glutathion-Level berechnet werden ($2 \text{ GSH} \rightarrow \text{GSSG}$).

3.13 Zellviabilitäts-Messung (MTT)

Zur Messung der Zellviabilität wurde ein colorimetrischer Assay angewandt. In einer 96-Well Kulturplatte wurden HepG2-Zellen mit einer Dichte von 10^4 Zellen/Well in 0,1 ml Optimem-Medium mit drei verschiedenen Selen-Konzentrationen (0, 25 nM, 250 nM) ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 1 μM Atorvastatin, 100 nM Cerivastatin oder als Kontrolle mit einem äquivalenten Volumen an Ethanol inkubiert. Um herauszufinden, ob die Zellen sich nach Statinbehandlung gegen einen Verursacher von oxidativem Stress verteidigen können, wurden die Zellen nach 3 d mit verschiedenen Konzentrationen tert-Butylhydroperoxid (t-BuOOH) versetzt. Diese Substanz ist ein Substrat für Glutathionperoxidasen (GPx) und sollte in vitalen Zellen enzymatisch detoxifiziert werden. Einen Tag nach t-BuOOH-Zugabe wurden die Zellen für 1,5 - 2 h mit 5 mg/ml 3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) inkubiert und anschließend mit einem Solubilisierungsreagenz, bestehend aus 10% SDS und 40% Dimethylformamid, pH 4, behandelt.

Der gelbe Farbstoff MTT wird in metabolisch aktiven Zellen durch die pyridinhaltigen Reduktionsäquivalente NADH und NADPH unter Beteiligung nicht näher bekannter Enzyme zu einem wasserunlöslichen Formazan reduziert. Die blau-violetten Farbstoffkristalle lassen sich durch einen Solubilisierungspuffer auflösen und photometrisch detektieren. Die Blaufärbung der Lösung ist äquivalent zur metabolischen Aktivität der Zellen.

Nach Auflösung der Kristalle über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde die Extinktion photometrisch bei 560 nm gemessen.

3.14 Messung reaktiver Sauerstoff-Spezies

Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) erhöhen den oxidativen Stress innerhalb der Zelle und schädigen diese dadurch maßgeblich. Um reaktive Sauerstoff-Spezies zu messen, wurden die Zellen mit einer Dichte von 10^4 Zellen/Well in einer 96-Well Platte in jeweils 100 μl Optimem-Medium ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen Atorvastatin oder

Cerivastatin inkubiert. Nach 4 d wurden die Zellen mit 1 μM 2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat (DCFA) behandelt und nach 1 h in einem auf 37°C temperierten Fluoreszenz-Plattenlesegerät (Wallac 1420 Victor³V multilabel counter) fluorimetrisch ausgemessen.

DCFA wird von den Zellen aufgenommen, wonach die Acetatreste durch zelleigene Esterasen hydrolytisch abgespalten werden. Das dabei entstandene nicht-membrangängige und nicht-fluoreszierende DCFH reagiert mit ROS, wodurch es zum Fluorophor (DCF) wird. Durch Anregung bei 485 nm kann eine Fluoreszenz bei 535 nm gemessen werden. Diese ist in erster Näherung proportional zur Menge an ROS innerhalb der Zelle.

Im Anschluss daran erfolgte eine Normierung auf metabolische Aktivität mittels des MTT-Tests (s. Kapitel 3.13). Die Zellen wurden mit 10 μl MTT-Lösung/Well für 1 h inkubiert. Nach Solubilisierung der entstandenen Formazan-Kristalle konnte die metabolische Aktivität bei 560 nm am Mikrotiterplatten-Lesegerät erfasst werden.

3.15 Quantitative real-time RT-PCR

Der Einfluss der Statine auf die Selenoproteine wurde auf transkriptioneller Ebene quantitativ mittels real-time RT-PCR untersucht.

Bei dieser Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, erfolgt eine Quantifizierung mit Hilfe eines Fluoreszenz-Farbstoffes (SYBR Green). Dieser Cyanin-Farbstoff interkaliert mit doppelsträngiger DNA und absorbiert im Farbstoff-DNA-Komplex blaues Licht (494 nm). Die Emission der Fluoreszenz steigt proportional mit jedem Vervielfältigungszyklus an und kann im grünen Bereich bei 521 nm gemessen werden.

Für diesen Versuch wurden die Zellen in 6-Well Kulturplatten mit einer Dichte von $4 \cdot 10^5$ Zellen/Well in 2 ml Optimem-Medium ausgesät und am nächsten Tag für 4 d mit 1 μM Atorvastatin oder 100 nM Cerivastatin inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die über den gleichen Zeitraum lediglich mit Ethanol behandelt worden waren. Nach 4 d wurden die Zellen mit 1 ml 1x PBS gewaschen und die RNA mittels eines Kits (Absolutely RNA Miniprep Kit) der Firma Stratagene nach Anweisung des Herstellers isoliert. Im Anschluss daran wurde die RNA-Menge mittels eines Photometers quantifiziert, indem die Extinktion bei 260 nm gemessen wurde. Mit anderen Reagenzien wie LDL oder 25-HC behandelte Zellen wurden in analoger Weise prozessiert.

Ein Aliquot jeder Probe wurde auf seine RNA-Menge normiert und daraus mittels des Omniscript Reverse-Transcription Kits der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers

cDNA synthetisiert. Die so entstandene cDNA konnte nun für die real-time PCR eingesetzt werden. Dafür wurden spezifische Primer gegen verschiedene Gene von der Firma Eurofines MWG Operon synthetisiert (s. Kapitel 2.6). Jede Probe wurde mit einem Mix aus 12,5 µl SYBR Green, 10,5 µl Wasser (RNase-/DNase-frei) und jeweils 0,5 µl des Forward- und Reverse-Primers versetzt und die quantitative PCR-Messung gestartet (iQ Real-Time-PCR Thermozykler). Das Programm umfasste 35 Zyklen, bestehend aus 30 s bei 94°C, 30 s bei 60°C und 60 s bei 72°C. Die Ergebnisse aller untersuchten Gene wurden auf die Transkription von Tubulin normiert.

3.16 Aufreinigung von humanem LDL aus Vollblut

Humanes LDL (Lipoproteine mit geringer Dichte) wurde von der Firma Sigma bezogen. Überdies wurde LDL auch nach dem Protokoll von Havel et al. aus humanem Vollblut eines gesunden männlichen Spenders isoliert und aufgereinigt (Havel et al. 1955).

Die im menschlichen Blut vorkommenden cholesterolhaltigen Lipoproteine werden anhand ihrer Dichten unterschieden (s. Tabelle 1.2). Reines Serum wird mit einer Dichte von 1,006 g/ml beschrieben.

Zur Präparation von frischem, nativen LDL wurden 40 ml Vollblut entnommen und dies unter Zugabe einiger kleiner Glaskügelchen bei Raumtemperatur für ca. 1 h stehen gelassen. Nach dieser Zeit konnte der geronnene Anteil bei 1500g für 10 min abzentrifugiert werden. Das so erhaltene Serum wurde mit 400 µl EDTA (53,7 mM gelöst in Wasser) versetzt und das LDL mittels Salzlösungen verschiedener Dichten aus Kaliumbromid (KBr) und Natriumchlorid (NaCl) in der Ultrazentrifuge (Beckmann, Rotor SW 41 Ti) isoliert. Dazu wurden zwei Standard-Lösungen angesetzt:

Lösung A: Verdünnungslösung; 0,15M NaCl; Dichte: 1,346 g/ml

Lösung B: Hauptlösung; 2,62 M NaCl + 2,97 M KBr; Dichte: 1,346 g/ml

Durch Mischen dieser beiden Lösungen A und B konnten Lösungen jeder beliebigen Dichte erhalten werden. Somit konnte in mehreren Zentrifugationsschritten (für 22h bei 50000g und 10°C) eine reine Lipoproteinfraktion erhalten werden. Zur Kontrolle der Aufreinigung wurde ein SDS-PAGE angefertigt, wobei kommerziell erworbenes LDL der Firma Sigma als Referenz diente.

Im Gel ist deutlich eine starke Apolipoprotein B-100-Bande bei 550 kDa zu sehen, was auf eine gute Trennung der Lipoproteine schließen lässt (s. Abb. 4.11).

Da die so erhaltene LDL-Fraktion stark in KBr-haltiger Lösung verdünnt war, wurde die Probe durch Zentrifugation über einer semipermeablen Membran (Vivaspin-Röhrchen, Trennporengröße 30000 kDa) bei 3400 g und 10°C aufkonzentriert. Dazu wurde die LDL-Lösung mit 1 ml NaCl-Lösung (0,15 M) überschichtet und für ca. 10 min zentrifugiert, bis sich das Volumen auf 0,5 ml reduziert hatte. Um die KBr-Konzentration weiter zu verringern, wurde dieser Vorgang zweimal wiederholt. Eine im Anschluss durchgeführte Protein-Quantifizierung mittels BCA (S. Kapitel 3.5) ergab eine Konzentration von 4,5 mg/ml.

3.17 Inkubation mit LDL und Cholesterol-Derivaten

Zur Inkubation mit LDL diente sowohl kommerziell erworbenes LDL der Firma Sigma als auch frisch isoliertes und aufgereinigtes LDL aus humanem Vollblut (s. Kapitel 3.16). Als Cholesterol-Derivat wurde 25-Hydroxycholesterol (25-HC) verwendet. Zusätzlich wurde Cholesterol im Komplex mit β -Methylcyclodextrin (MCD) freundlicherweise von Dr. M. Gamerding (Institut für Pathobiochemie, Universitätsmedizin Mainz) bereitgestellt. Dieser Komplex gilt als zellpermeabel, im Gegensatz zu reinem Cholesterol, und setzte sich zusammen aus 6,8 mM Cholesterol und 70 mM β -Cyclodextrin. Der Einfluss dieser Substanzen auf Selenoproteine sollte untersucht werden.

Die Zellen wurden dazu kultiviert und in 12-Well Platten ausgesät wie oben beschrieben (s. Kapitel 3.3), mit dem Unterschied, dass lediglich 0,5 ml Optimum-Medium zum Einsatz kamen. Die Zellen wurden dabei mit den jeweils angegebenen Konzentrationen der Cholesterol-Derivate inkubiert bzw. mit 0,1 bis 0,5 g/l LDL, wobei sich diese Angabe auf den Cholesterol-Gehalt des LDLs bezieht (die Zusammensetzung der Lipoproteine ist unter Kapitel 1.3.2, Tabelle 1.2 aufgeführt). Die Inkubationszeit betrug auch hier 4 d. Anschließend wurde verfahren wie oben bereits beschrieben (s. Kapitel 3.5-3.8 und 3.15).

3.18 Experimente mit humanen Hautfibroblasten

Im Rahmen dieser Arbeit kamen auch humane primäre Hautfibroblasten zum Einsatz. Dabei handelte es sich um eine Kontrolle (NHDF = normal human dermal fibroblasts) und zwei Fibroblastenkulturen aus Hautbiopsien, die Patienten mit einer Mevalonat-Kinase-Defizienz entnommen worden waren. Diese Zellen wurden freundlicherweise von Dr. D. Haas (Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Heidelberg), zur Verfügung gestellt. Die Handhabung dieser Zellen unterschied sich in einigen Punkten von der humaner

Hepatocyten. Für die Kultivierung wurde zwar das gleiche Medium verwendet (DMEM, 10% FCS, 1x Antibiotika/Antimykotika-Mix, 1 mM Pyruvat, 25 nM Na₂SeO₃), jedoch wurden die Zellkulturschalen nicht zusätzlich mit Poly-Ornithin beschichtet. Da diese Zellen nicht gänzlich auf FCS verzichten können, wurden die Zellen initial in 10% FCS-haltigem DMEM-Kulturmedium einer 6-Well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde dieses Medium abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit 1x PBS gewaschen und anschließend 2 ml FCS-freies Optimum-Medium mit 25 nM Na₂SeO₃ in jedes Well gegeben. Gleichzeitig erfolgte die Inkubation mit 50 µM MCD-Cholesterol oder 50 µM 25-Hydroxycholesterol für 4 d. Nach der Zellyse wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt (s. Kapitel 3.5-3.8).

3.19 Experimente mit mutanten Mäusen

Es wurden Mäuse mit zwei unterschiedlichen Mutationen herangezogen, um die Effekte einer in vivo-Modulation des Cholesterolspiegels auf die Selenoproteinsynthese zu untersuchen. Bei einer Mutation handelte es sich um einen Knockout des LDL-Rezeptors (LDL-R^{-/-}), bei der anderen um einen Knockout des Apolipoproteins E (ApoE^{-/-}). Beide Mauslinien wurden über die Firma The Jackson Laboratory, Maine, USA, bezogen. Zusätzlich wurden bei der gleichen Firma Kontroll-Mäuse geordert (C57BL/6). Alle Tiere waren männlich, 8 Wochen alt und wurden mit einer standardisierten Diät versorgt.

Nach kontrollierter Betäubung der Tiere mit Isofluran wurden diese durch zervikale Dislokation getötet, bevor anschließend die Organe entnommen wurden. Sämtliche Gewebe wurden sofort auf Eis gestellt und nachfolgend bei -80°C gelagert. Für die weiteren Experimente wurden die Gewebe mit 1 ml eiskaltem PBS, supplementiert mit Protease-Inhibitor-Cocktail, gewaschen, um Blut und Fellreste zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Lyse mit denaturierendem Puffer (s. Kapitel 2.5) und mechanische Homogenisierung. Um die Zellen aufzuschließen, wurde die erhaltene Suspension sonifiziert und die nichtlöslichen Fragmente abzentrifugiert. Der Überstand wurde für eine Proteinquantifizierung (s. Kapitel 3.5) herangezogen und anschließend mittels Western-Blot analysiert (s. Kapitel 3.6-3.8).

3.20 Cholesterolbestimmung

Für die Bestimmung des Leber-Cholesterols der Mäuse wurde ein Kit der Firma Cayman Chemical Company verwendet. Alle Reagenzien wurden gemäß Protokoll des Herstellers angesetzt. Der fluorimetrische Assay beruht auf einer Enzym-gekoppelten Methode, durch

welche sowohl das freie Cholesterol als auch das Gesamt-Cholesterol, bestehend aus freiem Cholesterol und Cholesterolestern, detektiert werden kann. Bei der Messung des Gesamt-Cholesterols werden zuvor die Ester durch Zugabe einer Esterase hydrolysiert. Das vorliegende freie Cholesterol wird anschließend oxidiert, wodurch als Nebenprodukt Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entsteht. Dieses wird durch das Reagenz ADHP (10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin) detektiert, welches durch die anwesende Meerrettich-Peroxidase (HRP) 1:1 zu fluoreszierendem Resorufin umgesetzt wird. Die Fluoreszenz von Resorufin wird durch Licht der Wellenlänge 530 - 580 nm angeregt und kann bei 585 - 595 nm gemessen werden.

Zur Bestimmung des Leber-Cholesterols der untersuchten Mäuse wurden 100 mg Gewebe eingewogen und mit 400 μl denaturierendem Puffer versetzt. Nach mechanischer Homogenisierung erfolgte der Aufschluss der Zellen durch Sonifizieren. Ein Teil des Lysats wurde für eine Proteinbestimmung verwendet (s. Kapitel 3.5). Jeweils 50 μl eines Cholesterol-Standards bzw. der Probe wurden in eine 96-Well Platte pipettiert und mit 50 μl einer Reagenzlösung, bestehend aus Reaktions-Puffer, dem Cholesterol-Detektor ADHP, HRP und dem Enzym Cholesteroloxidase, versetzt. Zur Bestimmung des Gesamt-Cholesterols enthielt die Reagenzlösung zusätzlich eine Cholesterolesterase zur Spaltung der Esterbindungen der Cholesterolester. Nach Inkubation für 30 min bei 37°C wurde die Resorufin-Fluoreszenz mit 530 nm angeregt und bei 590 nm detektiert.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von Selen auf die Selenoproteinexpression

Die Selenoproteinexpression ist maßgeblich vom Vorhandensein des Elements Selen (Se) abhängig. Durch Selenaufnahme wird eine Maschinerie in Gang gesetzt, die schließlich zur Expression von Selenoproteinen führt. Dieser Vorgang beinhaltet jedoch mehrere Schritte, angefangen von der Entstehung, Beladung (Abb. 1.1) (Xu et al. 2007) und Modifikation (Abb. 1.3) der Selenocystein-tRNA (Sec-tRNA) (Warner et al. 2000; Moustafa et al. 2001; Carlson et al. 2005), über die Transkription des Gens bis hin zur Faltung des aktiven Proteins. Die hierfür benötigte Menge an Selen ist in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich, da eine gewisse Hierarchie innerhalb der Selenoproteine und innerhalb verschiedenen Geweben existiert (Behne et al. 1988; Brigelius-Flohé 1999). Somit wurde zuerst in einem Vorversuch geklärt, ab welchem Zeitpunkt Selenoproteine in HepG2-Zellen auf Western-Blot Ebene detektiert werden können.

Hierfür wurden selendepletierte HepG2-Zellen mit jeweils 1 μM Natriumselenit (Na_2SeO_3) inkubiert und zeitabhängig geerntet. Die Proben wurden jeweils auf gleichen Proteingehalt normiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Ein anschließender Western-Blot ergab, dass erst nach 12 h Se-Inkubation ein schwaches Glutathionperoxidase 4 (GPx4)-Signal detektierbar war (Abb. 4.1). Demnach konnte darauf geschlossen werden, dass die Selenoproteinexpression mindestens 12 h in Anspruch nimmt. Für die weiteren Versuche wurde meist eine Inkubationszeit von 4 d gewählt.

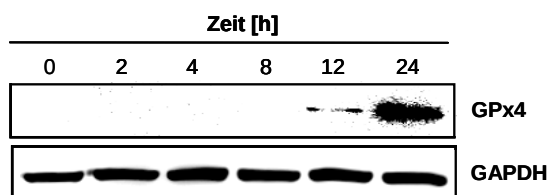


Abb 4.1.: Einbaugeschwindigkeit von Se in Selenoproteine. Western-Blot Analyse der GPx4 nach Seleninkubation in Abhängigkeit von der Zeit. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Darüber hinaus sollte eine Selenkonzentration gefunden werden, bei der die Proteinexpression zwar ausreichend vorhanden, jedoch immer noch steigerbar ist, um noch genügend Spielraum für eine Modulation zu haben. Dazu wurden HepG2-Zellen über mehrere Tage in Se-freiem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in Serum-freiem Optimem-Medium ausgesät und mit verschiedenen Se-Konzentrationen (Na_2SeO_3) inkubiert.

Nach 4 d wurde die Expression der Glutathionperoxidasen GPx1 und GPx4, welche äußerst selensensitiv sind (Bermano et al. 1995), mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot detektiert (Abb. 4.2). Es zeigte sich, dass diese beiden Proteine ohne Selensupplementation kaum exprimiert werden. Die Expression der GPx1 und GPx4 war maximal ab einer Konzentration von 100 nM, und konnte auch durch höhere Se-Konzentrationen nicht gesteigert werden. Novoselov et al. konnten in murinen Leberzellen ebenfalls feststellen, dass die Expression und die Aktivität der GPx ohne Selen gegen Null geht, sich aber bei hohen Konzentrationen ein Plateau einstellt, und die GPx-Expression nicht mehr gesteigert werden kann (Novoselov et al. 2005). Alle Selenoproteine enthalten mindestens ein Selenatom in Form von Selenocystein. Dieses ist essentiell für deren biologische Aktivität (Papp et al. 2007). Deshalb wurde für die zukünftige Kultivierung und die weiteren Experimente in der Regel eine Se-Konzentration von 25 nM gewählt, da die Expression der GPx hier zwar messbar, jedoch auch noch modulierbar ist.

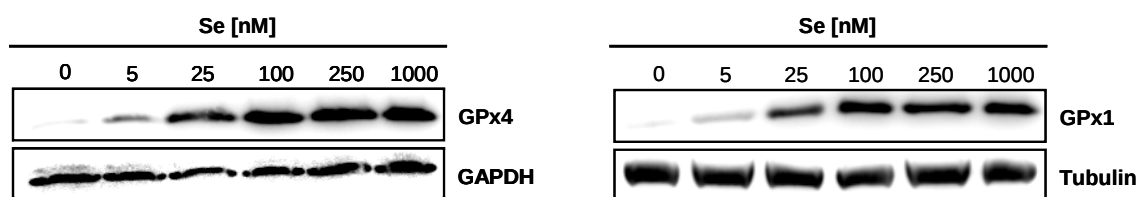


Abb. 4.2.: Einfluss der Se-Konzentration auf die Selenoproteinexpression. Western-Blot Analyse der GPx4 (**links**) und GPx1 (**rechts**) nach Inkubation mit verschiedenen Selenkonzentrationen. GAPDH bzw. Tubulin diente als Ladekontrolle.

4.2 Einfluss der Statine auf die Selenoproteinexpression

Um einen Zusammenhang zwischen der Selenoproteinsynthese und dem Cholesterolfstoffwechsel nachzuweisen, wurde in den folgenden Versuchen ein Inhibitor des Mevalonatpfades eingesetzt und dessen Einfluss auf die Selenoproteine untersucht. Der Mevalonatpfad (s. Kapitel 1.3.1, Abb. 1.7) wird hauptsächlich über ein Enzym reguliert, die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase, HMGCR). Dieses Protein ist geschwindigkeitsbestimmend für alle Folgereaktionen und kann mittels Statine reversibel und kompetitiv gehemmt werden (Tobert 2003). Dadurch sollte nicht nur die Cholesterolsynthese verringert werden, sondern möglicherweise auch die der Selenoproteine.

4.2.1 Selenoproteinexpression nach Statinbehandlung

Für die Behandlung wurden drei verschiedene Statine gewählt. Atorvastatin, das am häufigsten angewandte Statin, Cerivastatin, welches sich aufgrund seiner starken Potenz und den wohl damit verbundenen Nebenwirkungen nicht mehr auf dem Markt befindet, und Lovastatin, welches als Prodrug in Form eines Lactons verabreicht wird (Stark 2003). Die Inkubation erfolgte jeweils über 4 d in Serum-freiem Optimum-Medium, dem 25 nM Se zugegeben wurde.

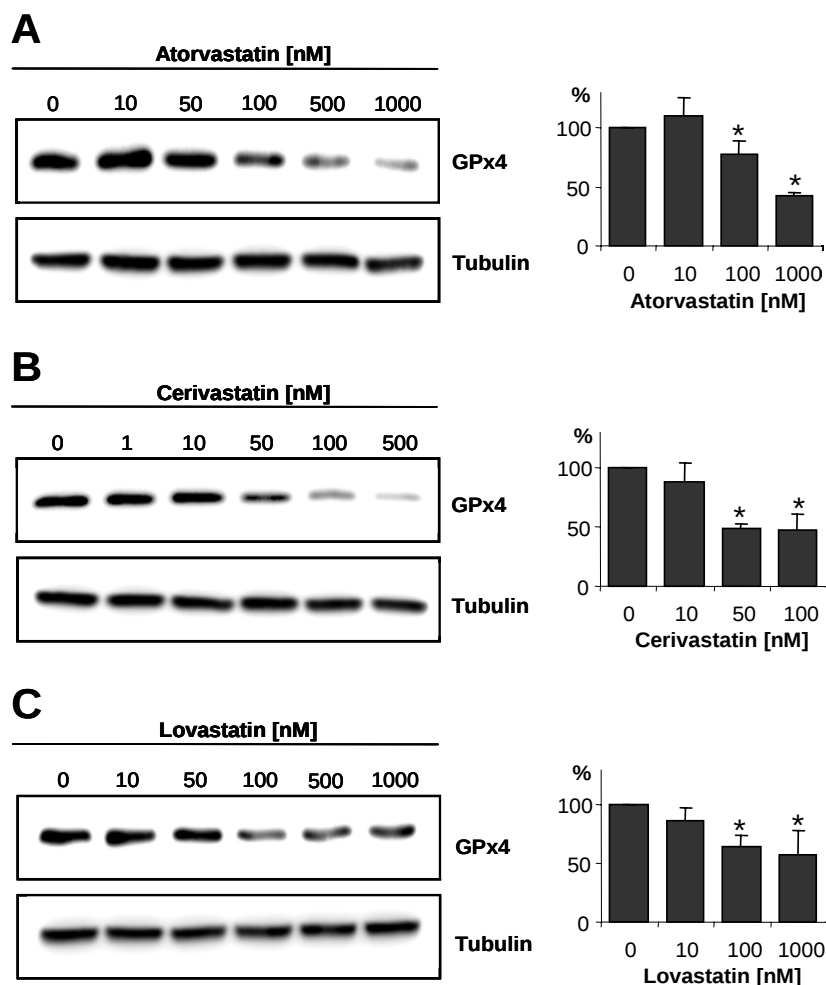


Abb. 4.3.: Western-Blot-Analyse der GPx4-Expression nach Statinbehandlung. Links: Die Abbildung zeigt jeweils einen Western-Blot von HepG2-Zellen nach 4 d Inkubation mit Atorvastatin (**A**), Cerivastatin (**B**) und Lovastatin (**C**). Die Proben wurden auf Proteingehalt normiert. Ein Antikörper gegen Tubulin diente als Ladekontrolle. Die Graphik (**rechts**) zeigt die Auswertung mittels des Quantifizierungsprogramms AIDA (Mittelwerte $\pm$ S.D.) von jeweils drei unterschiedlichen Experimenten ($n=3$). Sterne markieren eine signifikante Änderung gegenüber der unbehandelten Kontrolle (* $p<0,05$; One-Way ANOVA).

Abbildung 4.3. (links) zeigt die Western-Blot-Banden der GPx4 nach Statinbehandlung und die dazugehörige Ladekontrolle Tubulin. Die Quantifizierung der Banden ist rechts zu sehen. Bei allen drei Statinen ist mit steigender Konzentration ein Abfall der GPx4 Expression erkennbar. Sowohl bei Atorvastatin (A) als auch bei Lovastatin (C) wurde das Protein ab einer Konzentration von 100 nM signifikant verringert. Bei Cerivastatin (B) konnte die Signifikanz bereits bei 50 nM erreicht werden. Interessanterweise war bei der geringsten Atorvastatinkonzentration (10 nM) ein leichter, jedoch nicht signifikanter Anstieg der GPx4-Expression zu sehen (Abb. 4.3, A). Der Grund hierfür ist unklar.

4.2.2 ⁷⁵Se-Markierung von Statin-behandelten HepG2-Zellen

Der Einfluss der Statine auf die Selenoproteine wurde weiterhin durch radioaktive Markierung überprüft. Im Gegensatz zum Western-Blot, bei dem die Gesamtmenge eines einzelnen Proteins detektiert wird, kann hierbei die Neusynthese aller Selenoproteine ab einem bestimmten Zeitpunkt gemessen werden. Als Isotop wurde der Gammastrahler ⁷⁵Se verwendet. Dieser Strahler wurde in Form von H₂SeO₃ im „Research Reaction Center“ der Universität Missouri (MURR) synthetisiert und hat eine Halbwertszeit von 119 d. Auch dieses Experiment wurde, wie beim Western-Blot, in Serum-freiem, 25 nM Se-haltigem Optimum angesetzt, mit der Ausnahme, dass die Zellen 16 h vor ihrer Lyse mit 1 µCi des Isotops ⁷⁵Se inkubiert wurden.

Die Zellen waren in der Lage, das radioaktive Selenisotop binnen der 16-stündigen Inkubationszeit aufzunehmen und in ihre Biosynthese zu integrieren. Parallel dazu wurde ein identisches, nicht-radioaktives Kontrollexperiment durchgeführt, das für eine Proteinbestimmung eingesetzt wurde. Die Proben wurden mit Hilfe des Kontrollexperimentes auf Proteinmenge normiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 4.4., links). Das Gel wurde mit einer Coomassie-Blue-Lösung angefärbt, um die Banden sichtbar zu machen (Abb. 4.4., Mitte) und anschließend getrocknet. Durch Auflegen des getrockneten Gels auf eine Phosphorimager-Platte konnten die neusynthetisierten Selenoproteine detektiert werden.

Es zeigten sich mehrere Banden um 25 kDa, welche den GPx zugeordnet wurden und um 55 kDa, bei denen es sich um die Thioredoxinreduktasen (TRxR) handelt (Abb. 4.4., links). Es existieren sieben GPx-Isoenzyme, von denen fünf Selenoproteine sind (Gromer et al. 2005). Die GPx1 und GPx4 sind dabei die dominantesten und Abb. 4.2. zeigt, dass diese beiden Proteine in HepG2-Zellen exprimiert werden. Bislang wurden drei verschiedene TRxR identifiziert, wobei die TRxR3 hauptsächlich in Spermien exprimiert wird. Jedoch ist bekannt, dass noch eine größere Anzahl an TRxR-Spezies durch alternatives Spleißen existiert (Sun et

al. 2001; Miranda-Vizuete and Spyrou 2002). Bei allen drei Statinen (Abb. 4.4, A, B, C) ist mit steigender Konzentration ein deutlicher Abfall der GPx-Neusynthese erkennbar, ähnlich wie bei der Western-Blot Analyse (Abb. 4.3). Auch hier ist dieses Ergebnis bei Verwendung von Cerivastatin (B) am deutlichsten. Die TRxR-Bande variiert jedoch kaum, wird also von keinem der verwendeten Statine beeinflusst.

Die Selenoproteine werden in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark durch äußere Faktoren beeinflusst. So wird z.B. TRxR als Haushaltsgen eingestuft und ist somit kaum regulierbar (Arnér 2009). Die Coomassie-Blue-Färbung beweist, dass das Gel gleichmäßig beladen wurde (Abb. 4.4., Mitte) und der Statineffekt somit real ist und nicht von ungleichmäßiger Auftragung herrührt. Zur Quantifizierung der Banden wurden diese aus dem getrocknetem Gel ausgeschnitten und bei 45°C über Nacht in Szintillations-Flüssigkeit gelöst. Die Messwerte des Szintillationszählers sind in Abb. 4.4. (rechts) dargestellt. Innerhalb der TRxR-Banden existieren zwar Schwankungen, jedoch ist hier keine Tendenz zu erkennen. Die Abnahme der GPx-Banden ist dagegen deutlich und spiegelt die im Gel optisch erkennbaren Ergebnisse wider. Es existiert zwar ebenfalls eine gewisse Variabilität, dennoch konnte bei den hier eingesetzten Statinkonzentrationen eine Verringerung der GPx-Expression von über 50% gemessen werden. Es zeigt sich also, dass alle drei verwendeten Statine einen repressiven Effekt auf die Neusynthese der GPx haben. Offenbar sind Statine in der Lage, die Selenoproteinsynthese zu hemmen und die Gleichgewichtsniveaus zu senken.

Auch in diesem Experiment war ein leichter Anstieg der GPx-Expression nach Inkubation mit 10 nM Atorvastatin erkennbar, ähnlich wie bei der Western-Blot Analyse (Abb. 4.3, A).

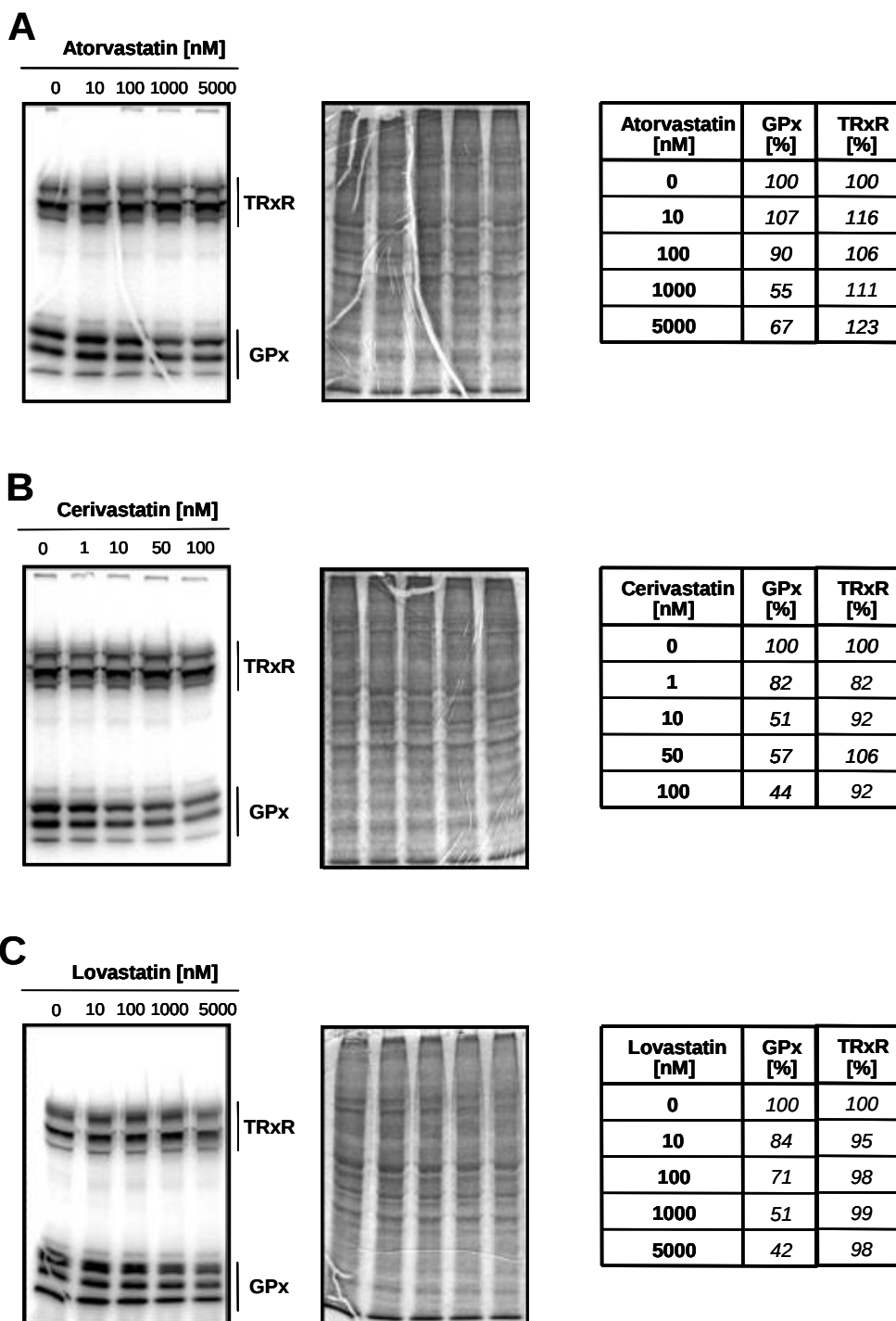


Abb. 4.4.: Radioaktive Markierung mit ^{75}Se nach Statinbehandlung. Links: SDS-PAGE von HepG2-Zellen nach Inkubationen mit unterschiedlichen Konzentrationen Atorvastatin (A), Cerivastatin (B) und Lovastatin (C) nach 4 d Inkubationszeit. Die radioaktive Markierung mit ^{75}Se erfolgte für 16 h. Detektiert wurden die markierten Selenoproteine mittels Autoradiographie. Ein nicht-radioaktives Kontrollexperiment wurde für eine Proteinbestimmung herangezogen. Mitte: Die Abbildungen repräsentieren die Coomassie-Blue-gefärbten Gele und stellen eine Ladekontrolle dar. GPx- und TRxR-Banden wurden mittels eines Szintillationszählers quantifiziert (rechts), wobei die Kontrolle als 100% gewertet wurde.

4.2.3 Effekt von Statinen auf die Glutathionperoxidase-Aktivität, die Glutathionspiegel und die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in HepG2-Zellen

GPx reduzieren Peroxide unter Verwendung von Glutathion zu den entsprechenden Alkoholen. Peroxide zählen zu den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und führen in Zellen zu erhöhtem oxidativen Stress, welcher schädlich für die Zellen ist (Halliwell 2007). Da Statine die Expression der GPx verringern (s. Abb. 4.3 und 4.4), sollte in einem weiteren Experiment die Aktivität dieses Enzyms gemessen werden. Die HepG2-Zellen wurden mit Atorvastatin und Cerivastatin behandelt und die GPx-Aktivität mittels eines gekoppelten Enzymassays gemessen. In diesem Assay wird die Peroxidaseaktivität indirekt durch die Zunahme der Absorption bei 340 nm, hervorgerufen durch die Oxidation von NADPH zu NADP⁺, detektiert (Saito et al. 2003).

Im Vergleich zur unbehandelten Probe ist mit zunehmender Statinkonzentration ein Absinken der GPx-Aktivität erkennbar (Abb. 4.5, A). Diese wird ab einer Konzentration von 100 nM Atorvastatin, bzw. ab 10 nM Cerivastatin, signifikant. Die Zellen sind ab dieser Konzentration nicht mehr in der Lage, das Peroxid vollständig umzusetzen. Offensichtlich hemmen die verwendeten Statine nicht nur die GPx-Expression (Abb. 4.3 und 4.4), sondern auch die Aktivität der Peroxidase (Abb. 4.5, A).

Da die Reaktion der GPx glutathionabhängig ist, wurden in einem weiteren Versuch die Glutathionlevel nach Statinbehandlung untersucht. Dazu wurden nach einem Protokoll von Griffith sowohl Gesamt-Glutathion (GSH + GSSG) als auch Glutathion in oxidiertem (GSSG) und reduziertem (GSH) Zustand gemessen. Nach Fällung der Proteine wurden die Proben mit einer Reaktionslösung bestehend aus NADPH, DTNB und GSH-R versetzt und nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 30°C das Gesamt-Glutathion bei 405 nm photometrisch gemessen. Durch Inkubation eines Aliquots der Proben mit Vinylpyridin, welches die Derivatisierung von GSH bewirkt, konnte GSSG detektiert werden (Griffith 1980). Abb. 4.5, B zeigt das Ergebnis dieses Assays. Die GSH-R gewährleistet, dass der Großteil des Glutathions in der Zelle im reduzierten Zustand vorliegt. Nur in diesem Zustand ist Glutathion in der Lage, die Zelle vor oxidativem Stress zu schützen.

Bei Behandlung der HepG2-Zellen mit Atorvastatin ist mit steigender Statinkonzentration keine Änderung des Gesamt-Glutathions erkennbar. Lediglich bei Cerivastatinbehandlung war eine signifikante Veränderung zu erkennen. Bei der niedrigsten Konzentration (10 nM) wurde ein leichter Anstieg des Gesamt-Glutathions induziert, bei der höchsten Konzentration (1 µM) ein starker Abfall. Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass sich aufgrund der starken Potenz von Cerivastatin bei dieser hohen Konzentration bereits ein

toxischer Effekt dieser Substanz bemerkbar machte. Weder Atorvastatin noch Cerivastatin führte zu einer Änderung des oxidierten GSSG. Somit zeigt sich, dass hohe Cerivastatinkonzentrationen nicht nur zu einer verminderten Aktivität der GPx führen, sondern auch zu einem Verlust an essentiellen reduzierten GSH.

Um zu überprüfen, ob eine verminderte GPx-Aktivität mit einem erhöhten oxidativen Stress einher geht, wurden die statinbehandelten Zellen für eine Stunde mit 2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat (DCFA) inkubiert und die Fluoreszenz bei 485/535 nm gemessen. DCFA wird intrazellulär durch Esterasen hydrolytisch gespalten und durch ROS oxidiert, wobei es fluoreszente Eigenschaften entwickelt. Die Fluoreszenz ist also ein Maß für den oxidativen Stress innerhalb der Zelle (Moosmann et al. 2001).

Dieser ist zwar bei 1 μ M Atorvastatin leicht erhöht, jedoch nicht signifikant (Abb. 4.5, C). Bei steigenden Cerivastatinkonzentrationen ist eine Tendenz zu steigender ROS-Entstehung deutlich zu erkennen, wenngleich der Anstieg in der Fluoreszenz erst bei der höchsten Konzentration von 1 μ M signifikant wird. Es scheint einen Zusammenhang zwischen Selenoproteinen und ROS zu geben, da vor allem hohe Cerivastatinkonzentrationen zu einer verminderten GPx-Aktivität und erniedrigtem GSH-Spiegel führt, was einen erhöhten oxidativen Stress zur Folge hat.

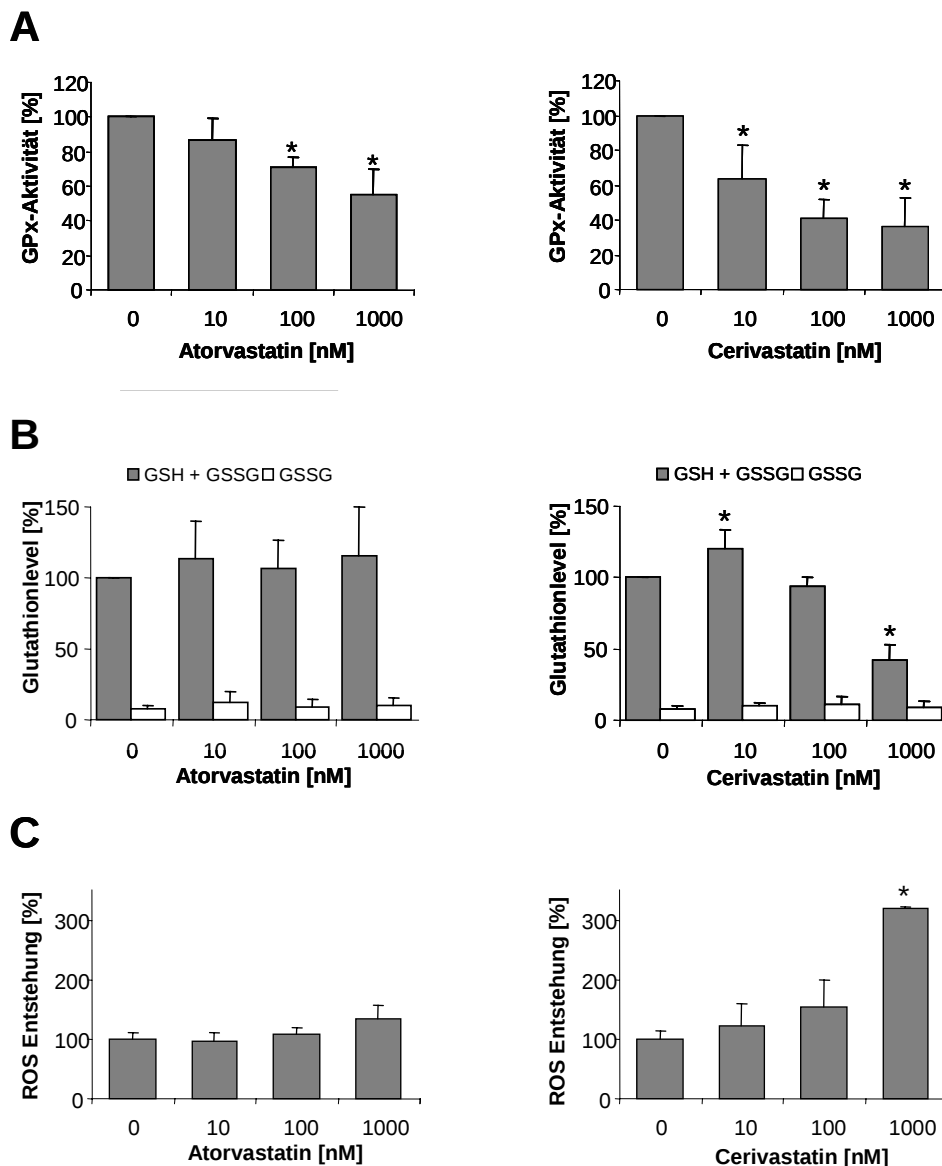


Abb. 4.5.: Glutathionperoxidase-Aktivität, Glutathionspiegel und Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in HepG2-Zellen nach 4 d Statinbehandlung. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Atorvastatin (**links**) oder Cerivastatin (**rechts**) inkubiert. **A:** Die cytosolische GPx-Aktivität von HepG2-Zellen gegenüber tBuOOH wurde durch einen gekoppelten Enzymassay photometrisch gemessen. **B:** Zur Bestimmung des Gesamt-Glutathions (GSH+GSSG) und des oxidierten Glutathions (GSSG) nach Statinbehandlung wurde die Reduktion von DTNB und die damit verbundene Änderung der Absorption, mit (GSSG) und ohne (GSH+GSSG) Vinylpyridin gemessen. **C:** Die ROS-Bildung wurde fluorimetrisch mittels DCFA detektiert und auf metabolische Aktivität mittels eines MTT-Tests normiert. Die Graphiken (A, B und C) zeigen jeweils die Mittelwerte $\pm$ S.D. von je drei unterschiedlichen Experimenten (n=3). Die unbehandelten Kontrollen wurden als 100% gewertet. Die Sterne zeigen eine signifikante Änderung gegenüber der unbehandelten Kontrolle (*p<0,05; One-Way ANOVA).

4.2.4 Viabilität von HepG2-Zellen nach Statinbehandlung in Abhängigkeit von Selen

Die GPx haben die Eigenschaft, ROS in Form von Peroxiden zu detoxifizieren und somit das Überleben der Zelle zu gewährleisten. Ist die GPx-Expression bzw. -Aktivität verringert, hätte dies zur Konsequenz, dass sich die Zelle weniger gut verteidigen könnte und möglicherweise apoptotisch wird. Da durch Statinbehandlung sowohl die Aktivität (Abb. 4.5, A), als auch die Expression der GPx sinkt (Abb. 4.3 und 4.4), besteht die Möglichkeit, dass die Zellen anfälliger gegenüber zusätzlichen Stressoren sind. Um dies zu überprüfen, wurden HepG2-Zellen über 4 d mit 1 μ M Atorvastatin oder 100 nM Cerivastatin inkubiert um einen Viabilitätstest mittels 3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durchzuführen. Einen Tag vor der MTT-Inkubation wurden die Zellen mit mehreren Konzentrationen an tert-Butyl-Hydroperoxid (tBuOOH), einem Substrat der GPx, das auch schon zur Messung der GPx-Aktivität diente, versetzt. MTT wird in metabolisch aktiven Zellen unter Beteiligung von NADH und NADPH zu Formazan-Kristallen reduziert. Nach Solubilisierung der Kristalle ist die Blaufärbung der Lösung äquivalent zur reduktiven metabolischen Aktivität der Zellen und kann photometrisch detektiert werden. Dieser colorimetrische Assay ist eine etablierte Methode zur Bestimmung der Zellviabilität (Mosmann 1983).

Bei unbehandelten HepG2-Zellen (ohne Statin) verringern selbst hohe tBuOOH-Konzentrationen von 600 μ M die Viabilität kaum (Abb. 4.6, A). Dies ändert sich jedoch bei Statinbehandlung. Durch Inkubation mit Atorvastatin werden die Zellen schon bei 300 μ M signifikant vulnerabel, bei Cerivastatin entsteht eine Signifikanz bereits bei 250 μ M tBuOOH (bezogen auf statinunbehandelte Zellen). Ab einer Peroxidkonzentration von 500 μ M existiert keine metabolische Aktivität mehr bei den statinbehandelten Zellen, wogegen die unbehandelten Zellen noch zu ca. 85% vital sind. Mikroskopisch zeigte sich dieser Verlust der metabolischen Aktivität in einer Zelllyse.

Um zu testen, ob die erhöhte Vulnerabilität tatsächlich auf Verminderung der GPx-Aktivität zurückzuführen ist, wurde dieser Versuch mit verschiedenen Selenkonzentrationen durchgeführt. Durch Selensupplementation lässt sich die Expression der GPx1 und GPx4 stimulieren (Abb. 4.2). Dies gilt auch bei gleichzeitiger Behandlung mit Atorvastatin (1 μ M) und Cerivastatin (100 nM) (Abb. 4.6, E). Eine Erhöhung der Selenkonzentration auf 25 nM bzw. 250 nM hatte eine signifikante Steigerung der GPx4 zur Folge, sowohl bei unbehandelten Zellen als auch bei statinbehandelten Zellen (Abb. 4.6, E). Durch Selenzugabe lässt sich somit die GPx4-Expression trotz Statinbehandlung stimulieren.

Abb. 4.6 B zeigt die Zellviabilität von statinunbehandelten Zellen nach tBuOOH-Einwirkung in Abhängigkeit von Selen. Die Zellen zeigen bei allen drei Selenkonzentrationen (0, 25 nM, 250 nM) eine relativ konstante Vitalität. Bei vorheriger Statinbehandlung jedoch sinkt die Viabilität der Zellen signifikant ab (Abb. 4.6, C und D). Durch Selensupplementation kann sowohl bei atorvastatininkubierten (Abb. 4.5, C) als auch bei cerivastatininkubierten Zellen (Abb. 4.5, D) die Toxizität von tBuOOH verringert werden. Das Überleben nach Atorvastatinbehandlung und Einwirkung von 450 μ M tBuOOH steigt durch Selenzugabe signifikant an (bezogen auf selenunbehandelte Zellen) (Abb. 4.5, C). Bei Cerivastatinbehandelten Zellen wird die Signifikanz bereits ab 350 μ M tBuOOH deutlich (Abb. 4.6, D). Somit zeigt sich, dass die Vulnerabilität von HepG2-Zellen gegenüber tBuOOH durch Statinbehandlung erhöht wird. Das Überleben der Zellen lässt sich jedoch durch Selensupplementation steigern, was vermutlich an einer Stimulation der GPx durch Selen liegt.

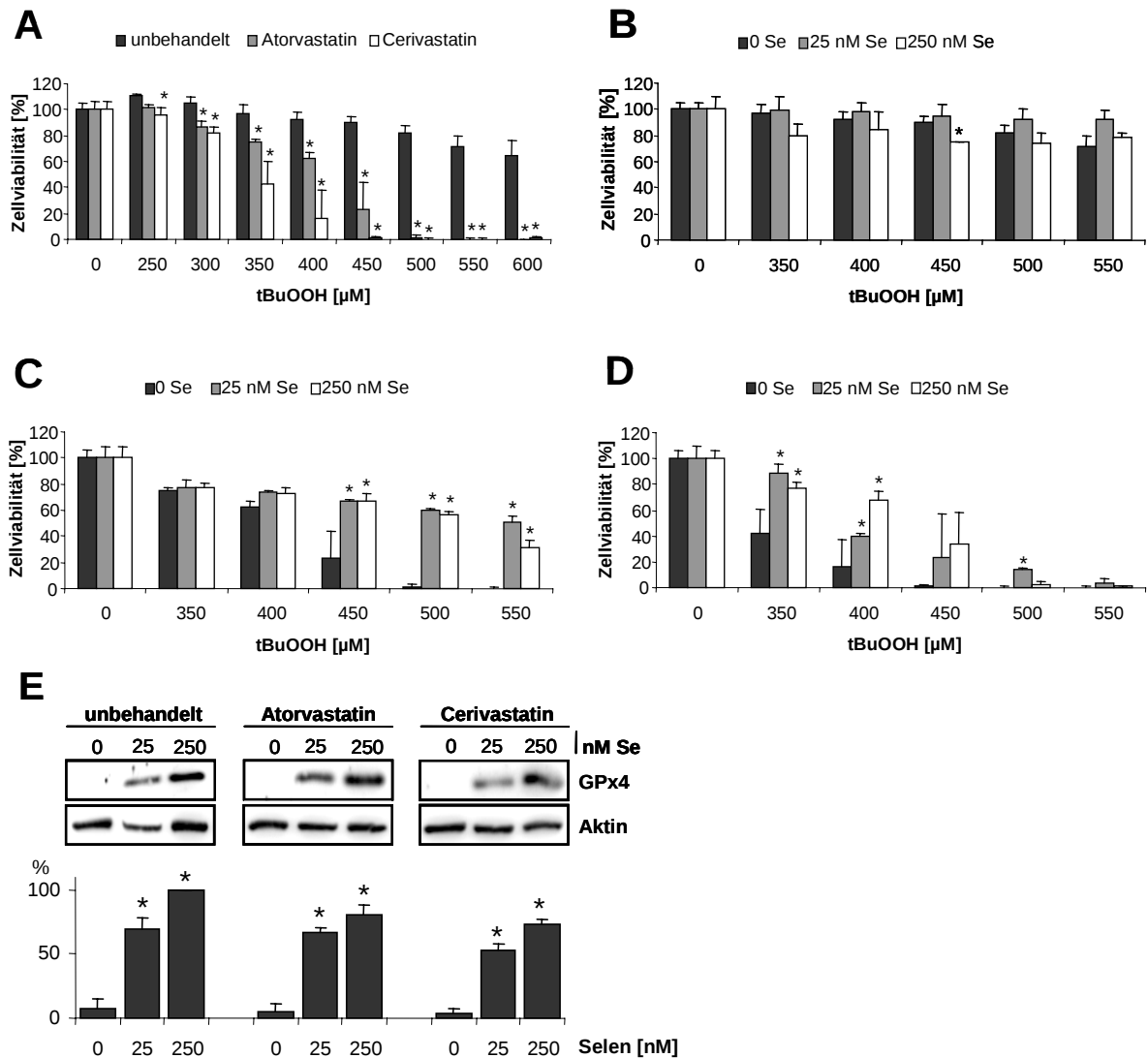


Abb. 4.6.: Viabilität von HepG2-Zellen nach Statinbehandlung in Abhängigkeit von Selen. Die Abbildungen A-D zeigen MTT-Tests von statinbehandelten Zellen in Abhängigkeit von der tBuOOH-Konzentration. Die Zellen wurden für 4 d mit entweder 1 μM Atorvastatin oder 100 nM Cerivastatin behandelt und nach 3 d zusätzlich für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen tBuOOH. Anschließend erfolgte die Inkubation mit MTT für 1,5 – 2 h. Die metabolische Aktivität von Zellen ohne tBuOOH wurde als 100% gewertet. **A:** Zellviabilität von selendepletierten Zellen, die entweder unbehandelt waren oder mit Atorvastatin oder Cerivastatin inkubiert wurden. **B-D:** Einfluss von verschiedenen Selenkonzentrationen (0, 25 nM, 250 nM Se) auf Zellen ohne Statinbehandlung (**B**), nach Atorvastatininkubation (**C**) oder Cerivastatininkubation (**D**). Die Graphen (A, B, C und D) zeigen jeweils die Mittelwerte ± S.D. aus drei Einzelerperimenten (n=3). Sterne zeigen eine signifikante Änderung der metabolischen Aktivität gegenüber Zellen ohne tBuOOH-Behandlung an (*p<0,01; One-Way ANOVA). **E:** Western-Blot von unbehandelten Zellen (ohne Statin) und von Zellen, die für 4 d mit Atorvastatin (1 μM) oder Cerivastatin (100 nM) inkubiert wurden, unter verschiedenen Selenbedingungen (0, 25 nM, 250 nM Se). Ein Antikörper gegen Aktin diente als Ladekontrolle. Die GPx4-Banden von zwei unabhängigen Experimenten (n=2) wurden graphisch (AIDA) ausgewertet (Mittelwerte ± S.D.) und die unbehandelten Zellen (ohne Statin) unter 250 nM Selen wurden als 100% gewertet. Sterne zeigen die

signifikante Änderung der GPx4-Bande gegenüber den korrespondierenden Zellen ohne Selen an (* $p < 0,05$; One-Way ANOVA).

4.2.5 Quantitative real-time RT-PCR nach Statinbehandlung

Die Wirkungsweise der Statine auf die Selenoproteine ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Offensichtlich sind sie in der Lage, die Expression (Abb. 4.3 und 4.4) und Aktivität (Abb. 4.5, A) von GPx zu reduzieren. Statine hemmen die Cholesterolsynthese im Mevalonatpfad und damit wahrscheinlich auch die Synthese von Zwischenprodukten, die zur Modifikation der Sec-tRNA dienen können. Durch quantitative real-time RT-PCR sollte überprüft werden, ob die Verringerung der GPx-Expression auf transkriptioneller oder translationaler Ebene erfolgt. Da die verwendeten Statine vor allem Einfluss auf die GPx1 und GPx4 hatten, wurde speziell die Transkription dieser beiden Gene untersucht. Als Referenz diente das Tubulin-Gen.

Die GPx1 und GPx4 wurden weder durch Behandlung mit Atorvastatin (Abb. 4.7, A), Cerivastatin (Abb. 4.7, B) oder Lovastatin (Abb. 4.7, C) transkriptionell beeinflusst. Als technische Kontrolle der PCR wurde zusätzlich ein HMGCR-Primer eingesetzt. Die Inhibition der HMGCR durch Statine hat eine signifikante Erhöhung der Transkriptionsrate dieses Proteins zur Folge (Endo et al. 1979). Sowohl Atorvastatin als auch Cerivastatin und Lovastatin führten bei den eingesetzten Konzentrationen zu einer massiven Hochregulierung der HMGCR-mRNA, was die Wirksamkeit der drei Statine bestätigt (Abb. 4.7, A, B, C). Somit kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass die Reduktion der GPx-Expression durch die Statine post-transkriptionell geschieht. Der Effekt beruht also wahrscheinlich auf einem Fehlen der Isoprenuntereinheiten, die im Mevalonat-Stoffwechsel synthetisiert werden und unter anderem zur Modifikation der Sec-tRNA eingesetzt werden.

Da die GPx am Abbau von ROS beteiligt sind, steigt durch eine Verminderung dieser Proteine der oxidative Stress innerhalb der Zelle an (Abb. 4.5, C) und müsste andere Verteidigungsmechanismen auf den Plan rufen. Suzuki et al. konnte zeigen, dass ein Knockout des murinen Sec-tRNA-Gens in Makrophagen oder in der Leber zu einem erhöhten oxidativen Stress führt und die Aktivierung von Targetgenen des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor-like 2 (Nrf2) zur Folge hat (Suzuki et al. 2008). Bei erhöhtem Stress bindet Nrf2 an eine bestimmte DNA-Sequenz, das Antioxidant Response Element (ARE), und kann somit die Transkription vieler antioxidativer Gene aktivieren. Zu diesen Targetgenen gehören unter anderem die Hämoxigenase 1 (HO1) und die NAD(P)H-Chinon Oxidoreduktase 1 (NQO). Die HO1 ist am Abbau von Häm beteiligt, indem es dessen Umsetzung zu Biliverdin

katalysiert und hat damit eine antioxidative und antiinflammatorische Wirkung. NQO reduziert Chinone und andere Elektrophile und detoxifiziert sie in einer 2-Elektronen Reduktion.

Die Inkubation der HepG2-Zellen mit 1 μ M Atorvastatin induzierte leichte Steigerungen der HO1- und NQO-Expression, welche aber beide nicht signifikant waren. Erst durch 100 nM Cerivastatin war eine eindeutige Hochregulierung dieser beiden Transkripte zu sehen (Abb. 4.7, D), was darauf hindeutet, dass durch Statininkubation der oxidative Stress erhöht wird (Abb. 4.5, C).

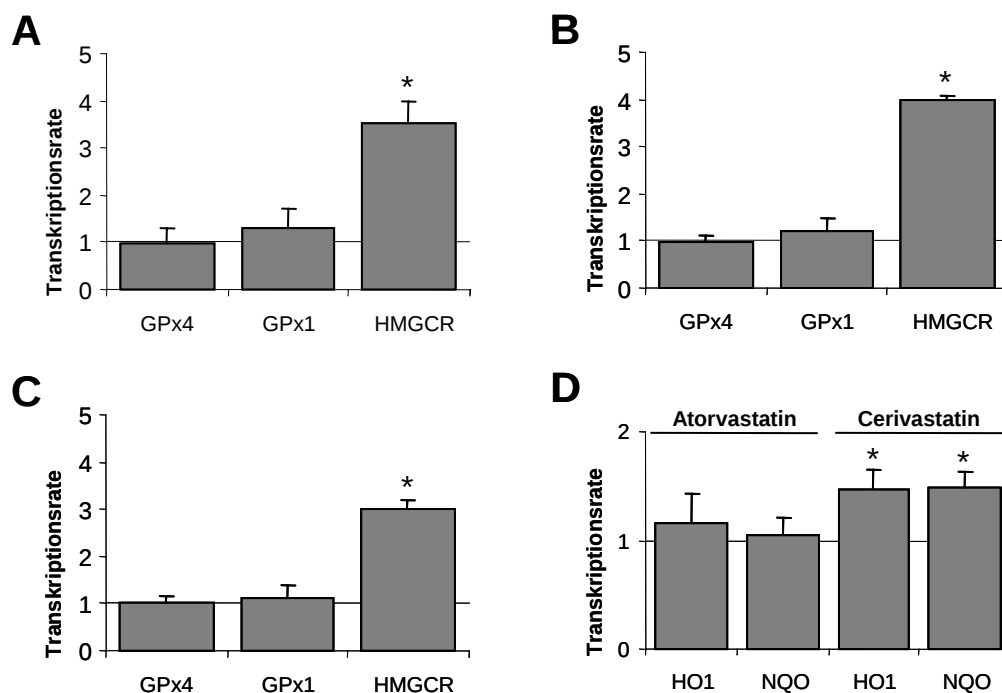


Abb. 4.7: Quantitative real-time PCR-Analyse der GPx1, GPx4, HMGCR, HO1 und NQO nach 4 d Statinbehandlung. A-C: Die Zellen wurden 4 d mit 1 μ M Atorvastatin (A), 100 nM Cerivastatin (B) oder 1 μ M Lovastatin (C) behandelt. Zu sehen ist jeweils der Einfluss auf die Transkription der GPx1, GPx4 und HMGCR verglichen mit unbehandelten Zellen (ohne Statin, Transkriptionsrate = 1). Die Daten spiegeln die Mittelwerte ($\pm$ S.D.) von 4 unabhängigen Experimenten (n=4) wider (n=2 für HMGCR). D: Transkriptionsrate von zwei unterschiedlichen Nrf2-Targetgenen, Hämoxygenase 1 (HO1) und NAD(P)H-Chinon Oxidoreduktase 1 (NQO), infolge von Statinbehandlung. Die Transkription dieser Gene ohne Statininkubation wurde als 1 gewertet. Jede RT-PCR wurde auf die Transkriptionsrate von Tubulin normiert. Sterne zeigen die signifikante Änderung der mRNA-Level gegenüber den statinunbehandelten Zellen (*p<0,05; One-Way ANOVA).

4.2.6 Reversibilität der statininduzierten Verminderung der Selenoproteinsynthese

Da die Suppression der Selenoproteinsynthese durch Statine post-transkriptionell erfolgt, sollte im Folgenden geklärt werden, ob dieser Effekt durch Inkubation der Zellen mit

Metaboliten des Mevalonatpfades eventuell aufgehoben werden könnte. Dazu wurden die Zellen mit Cerivastatin (500 μ M) behandelt und gleichzeitig mit Mevalonat, Geraniol, Geranylpyrophosphat, Farnesol, Geranylgeraniol oder Geranylgeranylpyrophosphat inkubiert (Abb. 4.8). Hierfür wurden hohe, aber nicht toxische Konzentrationen der Substanzen gewählt. In einem Vorversuch wurde mittels MTT-Assay bestimmt, welche maximalen Konzentrationen der einzelnen Substanzen eingesetzt werden konnten, ohne die Zellen zu schädigen. Alle Substanzen, mit Ausnahme von Mevalonat und Farnesol, wurden in einer Konzentration von 50 μ M eingesetzt. Da Mevalonat ganz am Anfang des Biosynthesepfades steht und schnell abgebaut wird, wurden die Zellen mit 1 mM dieser Substanz inkubiert, um sämtliche Abzweigungen im Pfad ausreichend versorgen zu können. Farnesol hingegen war leicht toxisch, so dass lediglich 10 μ M eingesetzt werden konnten. Außer Mevalonat bestehen alle verwendeten Substanzen aus Isopreneinheiten und haben z.B. eine Funktion in der Verankerung von kleinen trimeren G-Proteinen an der Membran.

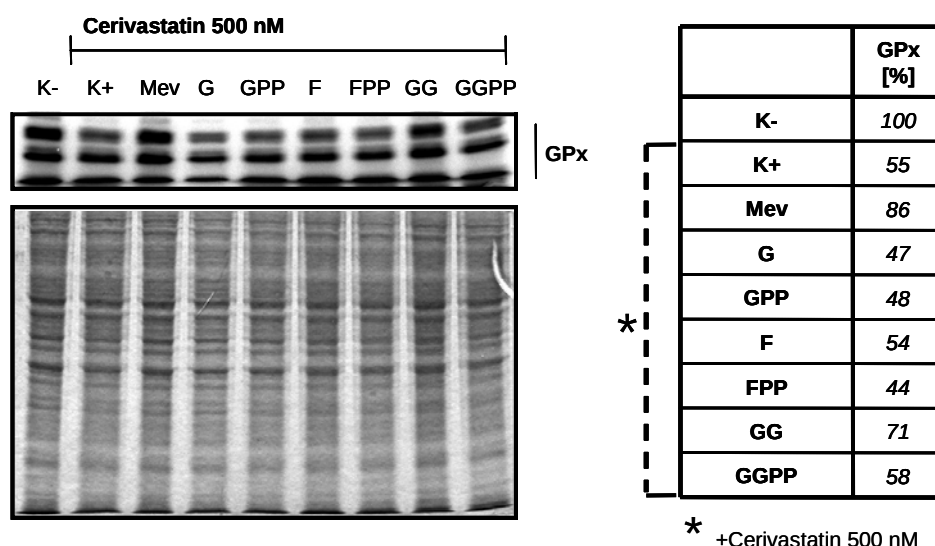


Abb. 4.8: Radioaktive ^{75}Se -Markierung von HepG2-Zellen, die mit Cerivastatin und Metaboliten des Mevalonatpfades inkubiert wurden. Links: SDS-PAGE von Zellen nach Inkubation mit 500 nM Cerivastatin und verschiedenen Metaboliten des Mevalonatpfades über 4 d. Die Probe K- wurde als einzige nicht mit Cerivastatin behandelt und stellt die Kontrolle dar. Die radioaktive Markierung mit ^{75}Se erfolgte für 16 h. Detektiert wurden die markierten Selenoproteine mittels Phosphoimager. Ein nicht-radioaktives Parallelexperiment wurde für eine Proteinbestimmung herangezogen. Die obere Grafik zeigt die GPx-Banden, die untere Abbildung repräsentiert das dazugehörige Coomassie-Blue gefärbte Gel und stellt eine Ladekontrolle dar. Rechts: Quantifizierung der GPx-Banden mittels Szintillationszähler, wobei die unbehandelte Kontrolle (K-) als 100% gewertet wurde. Abkürzungen: K-, unbehandelte Kontrolle (ohne Statin); K+, Kontrolle mit Statinbehandlung; Mev, Mevalonat; G, Geraniol; GPP, Geranylpyrophosphat; F, Farnesol; FPP, Farnesolpyrophosphat; GG, Geranylgeraniol; GGPP, Geranylgeranylpyrophosphat.

Einzig Mevalonat war in der Lage, die Expression der GPx fast vollständig wiederherzustellen (Abb. 4.8). Geranylgeraniol konnte die Suppression teilweise revertieren, alle anderen Substrate waren ineffektiv. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Selenoproteinsynthese mit dem Mevalonatpfad über Isopentenylpyrophosphat, welches für die Modifikation der Sec-tRNA benötigt wird, verknüpft ist, und dass der Statineffekt nicht auf Proteinprenylierung beruht. Durch eine Erhöhung der Mevalonatkonzentration kann die statininduzierte Isoprenoidsuppression revertiert werden, so dass die Isopentenylisierung der Sec-tRNA erfolgen kann. Der Effekt von Geranylgeraniol bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

4.3 Einfluss von Cholesterol und Cholesterolderivaten auf die Selenoproteinexpression

Die bisherigen Experimente wurden mit Statinen, einem Inhibitor der HMG-CoA-Reduktase, durchgeführt. Cholesterol hemmt dieses Enzym jedoch auch (Schoenheimer and Breusch; Goldstein and Brown 1990; Goldstein et al. 2006; Espenshade and Hughes 2007). Daher kamen in den folgenden Versuchen Cholesterol, bzw. Cholesterolderivate zum Einsatz, um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Mevalonatpfad und der Selenoproteinsynthese aufzuzeigen.

4.3.1 Selenoproteinexpression nach Inkubation mit 25-Hydroxycholesterol

25-Hydroxycholesterol (25-HC) wird von Zellen über Transporter und Diffusion leicht aufgenommen und ist ein besonders starker Inhibitor der HMGCR, bis zu 100 mal potenter als Cholesterol selbst (Brown et al. 1975). Es hemmt die Sterolsynthese durch Bindung an Insig, welches daraufhin den Sterolsensor SCAP bindet und den SCAP-SREBP Komplex in der ER-Membran hält (Adams et al. 2004). Dadurch wird die Prozessierung von SREBP verhindert und eine Hochregulation von Targetgenen wie die HMGCR bleibt aus (Brown and Goldstein 1975; Björkhem 2002; Adams et al. 2004).

Der Einfluss dieses Cholesterolderivats auf die Selenoproteinexpression auf Western-Blot Ebene ist in Abb. 4.9 zu sehen. HepG2-Zellen wurden in Serum-freiem, 25 nM selenhaltigen Medium mit verschiedenen Konzentrationen an 25-HC inkubiert und auf drei Selenoproteine analysiert, GPx4, TRxR1 (Abb. 4.9, A) und SelP (Abb. 4.9, B). Als Ladekontrolle für die GPx4- bzw. TRxR1-Analyse diente ein Antikörper gegen Aktin. Da SelP ein sekretorisches Protein (Burk and Hill 1994) ist wurden Zellüberstände für die Western-Blot-Analyse

herangezogen (Akesson et al. 1994). Die Beladung wurde durch Anfärben der Nitrocellulose-Membran mit Ponceau-Lösung überprüft. Dabei erschien eine deutliche und relativ gleichmäßige Bande bei ca. 70 kDa, welche dem Protein Albumin zuzuordnen ist. Schon geringe Konzentrationen an 25-HC führten zu einer Verminderung der GPx4- und SelP-Expression. Die Auswertung der Banden bei 50 μ M 25-HC ergab eine signifikante Reduktion um jeweils ca. 60% (Abb. 4.9, A und B, unten), verglichen mit einer unbehandelten Kontrolle. 25-HC hat somit einen Einfluss auf die Selenoproteinexpression. Das Ergebnis ist wie bei der Statinbehandlung eine Verminderung dieser Proteine, wenn auch möglicherweise durch verschiedene Mechanismen. Trotz des signifikanten Einflusses auf die GPx4 und SelP hatte eine Behandlung mit 25-HC keine Wirkung auf die TRxR1-Expression.

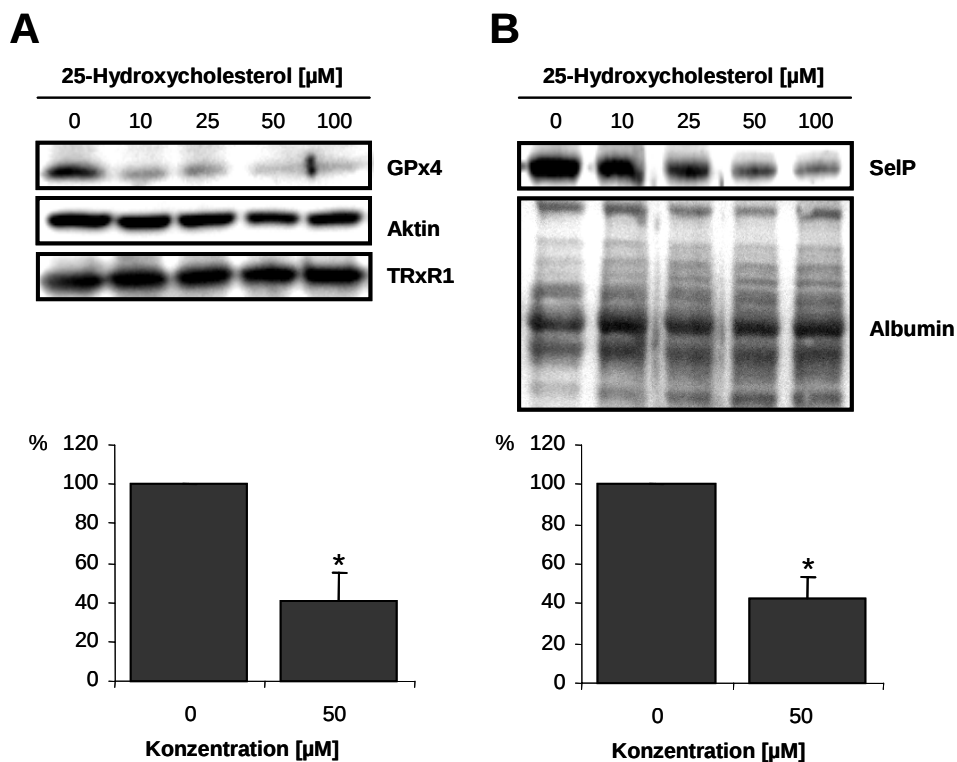


Abb. 4.9.: Western-Blot Analyse der GPx4, TRxR1 und SelP nach Inkubation mit 25-Hydroxycholesterol. Die obere Abbildung zeigt jeweils einen Western-Blot gegen GPx4 und TRxR1 (**A**) und SelP (**B**) aus HepG2-Zellen nach 4 d Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an 25-Hydroxycholesterol (25-HC). Ein Antikörper gegen Aktin diente als Ladekontrolle für die GPx4- und TRxR1-Expression. Die Beladung des SelP-Blots wurde durch Anfärben der Membran mit einer Ponceau-Lösung überprüft, wodurch eine deutliche Albumin-Bande sichtbar wurde. Die untere Abbildung zeigt die Mittelwerte ($\pm$ S.D.) von 3 verschiedenen Western-Blots (n=3) aus unbehandelten Kontrollen und Zellen, die mit 50 μ M 25-HC inkubiert wurden. Die Auswertung erfolgte mittels des Quantifizierungsprogramms AIDA. Sterne markieren eine signifikante Änderung gegenüber der unbehandelten Kontrolle (* $p < 0,05$; One-Way ANOVA).

4.3.2 Selenoproteinexpression nach Inkubation mit LDL

Im Folgenden sollte geklärt werden, ob LDL-Cholesterol eine ähnliche Wirkung auf die Selenoproteine in HepG2-Zellen hat wie 25-HC. Dazu wurden die Zellen mit humanem LDL-Cholesterol der Firma Sigma behandelt. Die Zellen wurden 4 d in Serum-freiem, 25 nM selenhaltigem Medium mit LDL-Cholesterol inkubiert (Abb. 4.10, A). Die verwendete Konzentration bezieht sich auf den Cholesterolgehalt (in g/l) im LDL. Dieses Lipoprotein besteht zu ca. 20% aus Protein und zu etwa 50% aus Cholesterol. Anhand der angegebenen Proteinkonzentration konnte so die Menge an LDL errechnet werden, welches der entsprechenden Cholesterolkonzentration entspricht.

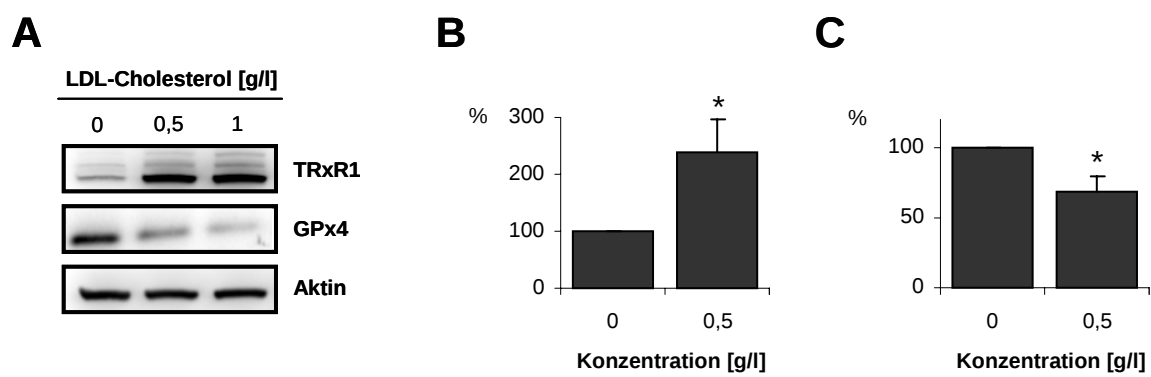


Abb. 4.10.: Western-Blot Analyse von TRxR1 und GPx4 nach Inkubation mit humanem LDL-Cholesterol.

(A) Western-Blot gegen TRxR1 und GPx4 von HepG2-Zellen nach 4 d Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an LDL-Cholesterol (Sigma). Als Ladekontrolle diente ein Antikörper gegen Aktin. (B-C) Auswertung der TRxR1- (B) und GPx4- Banden (C) von 3 verschiedenen Western-Blots (n=3) (Mittelwerte $\pm$ S.D.) von unbehandelten Kontrollen und Zellen, die mit 0,5 g/l LDL-Cholesterol inkubiert wurden. Ausgewertet wurde mittels des Quantifizierungsprogramms AIDA. Sterne markieren eine signifikante Änderung gegenüber der unbehandelten Kontrolle (* $p < 0,05$; One-Way ANOVA).

Ebenso wie die Behandlung mit 25-HC hatte 0,5 g/l LDL-Cholesterol eine signifikante Verringerung der GPx4-Expression um knapp 35% zur Folge (Abb. 4.10, A und C). Die verwendete Menge an LDL entspricht einer Cholesterolkonzentration von 2,6 mM. Damit liegt die eingesetzte Konzentration noch unterhalb der durchschnittlichen LDL-Cholesterolkonzentration im menschlichen Plasma, welche beim Erwachsenen um 4,4 mM liegt. Die Inkubation mit LDL-Cholesterol wirkte sich, im Gegensatz zur Behandlung mit 25-HC, induzierend auf die TRxR1 aus (Abb. 4.10, A und B). Hier konnte eine Steigerung der Expression um fast 140% beobachtet werden. Ein Grund für die enorme Induktion der TRxR1 könnten oxidierte Metabolite im LDL sein. LDL-Cholesterol ist sehr leicht oxidierbar und kann nur sehr kurze Zeit bei 4°C gelagert werden. Furman et al und Hägg et al konnten

zeigen, dass nur oxidiertes LDL, nicht aber natives, in Makrophagen zu einer transkriptionellen Hochregulierung der TRxR1 führt (Furman et al. 2004; Hägg et al. 2006).

Um zu überprüfen, ob sich in dem gekauften LDL bereits solche oxidierten Metabolite befinden, wurde nach einem Protokoll von Moosmann et al. ein Aliquot mit 10 μM CuSO_4 und 500 μM MgSO_4 über Nacht bei 37°C inkubiert und die Metalle anschließend über eine Sephadex G25-Säule gegen PBS ausgetauscht (Moosmann and Behl 1999). Eine photometrische Analyse beider Proben ergab ein identisches Spektrum. Sowohl das originale als auch das absichtlich oxidierte LDL hatten einen Peak bei 234 nm. Daraus wurde geschlossen, dass das originale LDL bereits oxidierte Metabolite enthielt. Ein neu bestelltes Aliquot an humanem LDL der Firma Sigma ergab ein ähnliches Bild.

Deshalb wurde LDL aus menschlichem Vollblut isoliert. Dies geschah mittels Ultrazentrifugation über mehrere Schritte nach einem Protokoll von Harvel et al. (Havel et al. 1955). Nach der Isolierung wurden jeweils ein Aliquot des gekauften und des selbst isoliertem LDL durch eine SDS-PAGE auf ihre Zusammensetzung hin analysiert (Abb. 4.11.). In Linie 1 wurde das eigens isolierte LDL aufgetragen, in Linie 2 das von Sigma gekaufte.

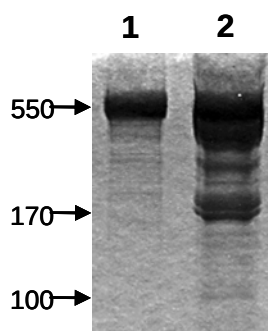


Abb. 4.11.: SDS-PAGE von selbst isoliertem LDL-Cholesterol aus menschlichem Vollblut (1) und von gekauftem LDL-Cholesterol (2). Beide Linien zeigen eine deutliche Bande bei ca. 550 kDa, bei der es sich um Apolipoprotein-B100 handelt.

LDL kann mittels Elektrophorese durch sein Apolipoprotein-B100 (Apo-B100) identifiziert werden. Beide Proben 1 und 2 zeigen eine deutliche Bande bei ca. 550 kDa, bei der es sich um Apo-B100 handelt. Zudem traten in Linie 2 noch weitere Banden auf, die jedoch nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Wahrscheinlich entstanden diese Produkte durch oxidative Fragmentierung des LDLs.

Im folgenden Versuch wurden HepG2-Zellen nun mit dem aus Vollblut isoliertem LDL-Cholesterol über 4 d inkubiert und anschließend ein Western-Blot durchgeführt. Eine Analyse der TRxR1-Bande ist in Abb. 4.12 dargestellt.

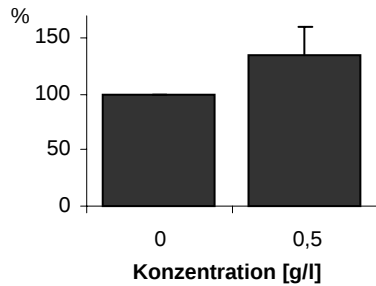


Abb. 4.12.: Expression von TRxR1 nach Inkubation mit aus menschlichem Vollblut isoliertem LDL-Cholesterol. Die Abbildung zeigt die Auswertung der Western-Blot Banden (Mittelwerte $\pm$ S.D.) von drei unterschiedlichen Experimenten ($n=3$). Die Auswertung von unbehandelten Kontrollen und Zellen, die mit 0,5 g/l LDL-Cholesterol inkubiert wurden, erfolgte mittels des Quantifizierungsprogramms AIDA. Eine Signifikanz ($p<0,05$) wurde nicht erreicht (One-Way ANOVA).

Es zeigte sich eine Erhöhung der TRxR1-Expression um nur noch ca. 35% (Abb. 4.12) nach der Behandlung mit LDL, welche jedoch nicht signifikant war. Die Steigerung war also bei weitem nicht so hoch wie bei der Inkubation mit gekauftem LDL (Abb. 4.10, B). Dies erhärtet die Theorie, dass die TRxR1-Steigerung nicht durch Cholesterol selbst, sondern durch oxidierte Metabolite oder Proteinfragmente im LDL verursacht wurde.

4.3.3 Selenoproteinexpression nach Inkubation mit Methyl- β -Cyclodextrin-Cholesterol

Um die Theorie zu überprüfen, dass die Verminderung der GPx nach LDL-Inkubation (Abb. 4.10, A und C) durch Cholesterol verursacht wurde, wurden HepG2-Zellen mit Methyl- β -Cyclodextrin-Cholesterol (MCD-Cholesterol) inkubiert. Die Verbindung wurde von Dr. M. Gamerdinger (Universitätsmedizin, Pathobiochemie, Mainz) synthetisiert und freundlicherweise für die folgenden Versuche zur Verfügung gestellt.

Cholesterol ist extrem hydrophob. Um es partiell zellgängig zu machen, bedarf es einer Verpackung durch Methyl- β -Cyclodextrin (MCD) (Gamerdinger et al. 2007). β -Cyclodextrine sind cyclische Oligosaccharide mit einer polaren Oberfläche und einem hydrophoben Inneren. Durch Aufnahme und Einschluss einer lipophilen Substanz kann deren Wasserlöslichkeit deutlich erhöht werden. Die Affinität von MCD gegenüber Cholesterol ist extrem hoch, was es zu sehr guten Cholesterol-Akzeptoren macht.

Um herauszufinden, ob das in der Verbindung enthaltene MCD selbst einen Effekt auf Selenoproteine ausübt, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen dieser Substanz inkubiert. Allerdings wirkte sich MCD alleine sehr toxisch auf die Zellen aus. Eine Konzentration von 1 mM führte zur kompletten Lyse der Zellen. Bei Inkubation von Zellen

mit reinem MCD wird das in den Membranen vorhandene Cholesterol extrahiert, wodurch die Zelle ihre Stabilität verliert und letztlich zugrunde geht (Ohvo et al. 1997). In Verbindung mit Cholesterol verlor die Substanz MCD jedoch ihren toxischen Effekt.

Abb. 4.13, A zeigt eine Western-Blot Analyse von HepG2-Zellen, die mit 100 μM reinem Cholesterol oder 100 μM MCD-Cholesterol behandelt wurden. Reines Cholesterol hatte keinen Einfluss auf die untersuchten Selenoproteine, die TRxR1- und die GPx4-Bande entsprechen denen von unbehandelten Zellen. Die Erklärung hierfür liegt wohl darin begründet, dass in Ethanol appliziertes Cholesterol nicht zellgängig ist. In Verbindung mit MCD kann Cholesterol zwar laut Literatur von vielen Zellen aufgenommen werden, jedoch hatte MCD-Cholesterol ebenfalls keinen Einfluss auf die Selenoproteinexpression. Sowohl die TRxR1-, als auch die GPx4-Level blieben bei Behandlung mit 100 μM MCD-Cholesterol konstant (Abb. 4.13). Die TRxR1-Expression (Abb. 4.13, B) stieg um ca. 13% an, was jedoch eine Signifikanz verfehlte. Es konnte keine Änderung der GPx4-Expression (Abb. 4.13, C) detektiert werden. Eine mögliche Erklärung könnte in einer fehlenden Zellgängigkeit von MCD-Cholesterol in HepG2-Zellen liegen. Experimentelle Hinweise hierfür werden in den folgenden Abschnitten 4.3.3 und 4.3.4 beschrieben.

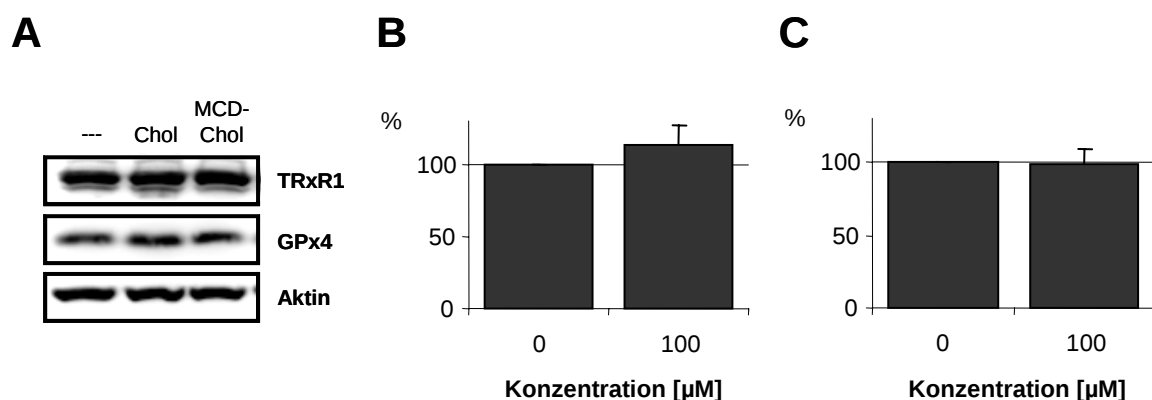


Abb. 4.13.: Einfluss von Cholesterol und MCD-Cholesterol auf die Selenoprotein-Expression. (A) Western-Blot Analyse von unbehandelten HepG2-Zellen (---) und Zellen, die über 4 d mit 100 μM reinem Cholesterol (Chol) bzw. 100 μM MCD-Cholesterol (MCD-Chol) behandelt wurden. Die Auswertung der TRxR1- (B) und GPx4-Banden (C) von 4 unabhängigen Experimenten (n=4) erfolgte mittels des Quantifizierungsprogramms AIDA. Eine Signifikanz ($p < 0,05$) wurde nicht erreicht (One-Way ANOVA).

4.3.4 Quantitative real-time RT-PCR nach Inkubation mit LDL-Cholesterol, 25-Hydroxycholesterol, MCD-Cholesterol

Da die Behandlung der HepG2-Zellen mit 25-HC bzw. LDL einen Einfluss auf die Selenoproteinexpression hatte, sollte diese Wirkung auch auf Transkriptionsebene untersucht werden. Dazu wurden quantitative real-time RT-PCR-Analysen nach 25-HC- bzw. LDL-

Cholesterol-Inkubation durchgeführt und die Transkriptionsraten der GPx1, GPx4, TRxR1 und HMGCR ermittelt. Die Behandlung mit MCD-Cholesterol ergab keine Änderung der untersuchten Selenoproteine im Western-Blot. Daher sollte die Wirkung dieser Substanz ebenfalls auf transkriptioneller Ebene untersucht werden.

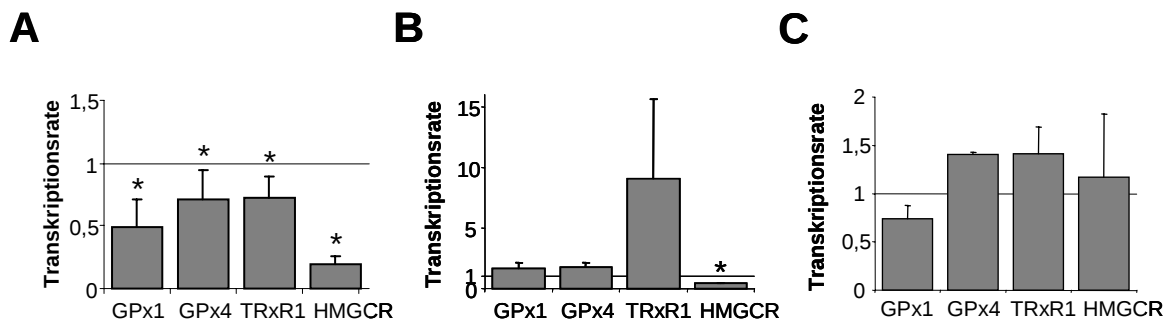


Abb. 4.14.: Quantitative real-Time RT-PCR-Analysen von HepG2-Zellen nach Inkubation mit 50 μ M 25-HC (A), 0,5 g/l LDL-Cholesterol (B) und 100 μ M MCD-Cholesterol (C). Das hierfür verwendete LDL wurde von der Firma Sigma erhalten. Die Inkubationsdauer betrug jeweils 4 d. Anschließend wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die PCR-Analyse umfasste jeweils die Gene für GPx1, GPx4, TRxR1 und HMGCR. Alle Ergebnisse wurden auf die Transkription von Tubulin normiert. Für die Auswertung wurden zwei (B), drei (C), bzw. fünf (A) unterschiedliche Experimente herangezogen (Mittelwerte $\pm$ S.D.). Die Graphen zeigen die Änderung der Transkription verglichen mit unbehandelten Kontrollen (Transkriptionslevel=1). Sterne markieren eine Signifikanz gegenüber der unbehandelten Kontrolle (* p <0,05; One-Way ANOVA).

MCD-Cholesterol hatte nur minimale Auswirkung auf die Transkription der untersuchten Gene (Abb. 4.14, C). Besonders interessant ist die konstante Transkriptionsrate der HMGCR. Daraus und aus dem Ergebnis der Western-Blot Analyse (Abb. 4.13) kann geschlossen werden, dass MCD-Cholesterol offenbar nicht HepG2-zellgängig ist oder sein Cholesterol nicht freisetzen kann. Im Gegensatz dazu waren 25-HC (Abb. 4.14, A) und LDL (Abb. 4.14, A) erwartungsgemäß in der Lage, die HMGCR-Transkription stark zu unterdrücken. Durch die LDL-Inkubation war auch eine Steigerung der TRxR1-mRNA messbar (Abb. 4.14, B), die jedoch aufgrund der geringen Zahl an Wiederholungen ($n=2$) und der relativ hohen Standardabweichungen nicht statistisch signifikant war. Da für die PCR-Analysen das von Sigma gekaufte LDL verwendet wurde, welches offensichtlich nicht völlig nativ war und oxidierte Metabolite enthielt (Abb. 4.11), sind diese Ergebnisse mit denen von Abb. 4.10 (A und B) zu vergleichen, in welchen dasselbe LDL verwendet wurde. Auch in diesem Western-Blot war eine Steigerung der TRxR1-Expression durch Behandlung mit LDL-Cholesterol zu sehen. Durch Inkubation mit der reinen Substanz 25-HC konnte jedoch keinerlei Hochregulation der TRxR1-Transkription beobachtet werden (Abb. 4.14, A), was die Theorie erhärtet, dass die TRxR1 nicht durch Cholesterol selbst beeinflusst wird, sondern durch

oxidierte Metabolite oder Apo-B100-Fragmente, wie sie wohl in dieser LDL-Charge enthalten waren. Somit haben oxidierte LDL-Metabolite offensichtlich einen Einfluss auf die TRxR1-Transkription. Diese Interpretation steht im Einklang mit den Befunden von Furman et al., welche in humanen Makrophagen ebenfalls eine spezifische Induktion der TRxR1 als Antwort auf künstlich oxidiertes LDL, nicht jedoch auf natives LDL beobachtet hatten (Furman et al. 2004). Auf die mRNA der GPx1 und GPx4 wirkte sich 25-HC mild suppressiv aus (Abb. 4.14, A). Da im Western-Blot jedoch eine starke Suppression der GPx4 zu sehen war (Abb. 4.9, A), kann daraus geschlossen werden, dass diese verminderte Expression wohl wie bei der Statinbehandlung zumindest teilweise auf ein Fehlen der Sec-tRNA-Modifikation zurückzuführen ist. Diese Schlußfolgerung wird durch die Tatsache untermauert, dass LDL ebenfalls einen deutlichen suppressiven Effekt auf die GPx4-Expression (Abb. 4.10, C), jedoch nicht auf deren Transkription (Abb. 4.14, B) hatte. Die Klärung der molekularen Ursachen für die spezifische Modulation der GPx1-mRNA durch 25-HC benötigt weitere Untersuchungen.

4.3.5 Experimente in humanen Fibroblasten

Der Effekt der beschriebenen Cholesterolderivate wurde zusätzlich in anderen Zelltypen überprüft, um die Möglichkeit auszuschließen, dass es sich dabei um eine Besonderheit hepatozellulärer Karzinomzellen handeln könnte. Deswegen wurden primäre humane Hautfibroblasten analysiert, die freundlicherweise von Dr. D. Haas (Universitätsklinikum, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurden. Bei diesen Fibroblasten handelte es sich um eine Kontrolle (NHDF) und zwei Biopsien, die von Kindern entnommen worden waren, welche an einer angeborenen Mevalonat-Kinase (MK) Defizienz leiden. Die MK ist wie die HMGCR ebenfalls ein Enzym des Mevalonatpfads. Eine Suppression dieses Proteins könnte auf die Selenoproteinsynthese einen ähnlichen Einfluss haben wie eine Hemmung der HMGCR durch Statine. Die MK-Defizienz zeichnet sich durch eine stark erhöhte Mevanolat-Ausscheidung über die Niere aus und hat allgemeine Entwicklungsstörungen zur Folge (Haas et al. 2001; Prietsch et al. 2003; Houten, Schneiders, et al. 2003; Houten, Frenkel, et al. 2003; Haas and Hoffmann 2007). Trotz der stark verringerten MK-Aktivität sind die Spiegel an Cholesterol und Isoprenoiden bei diesen Patienten jedoch unauffällig. Es wird postuliert, dass dies durch eine kompensatorische Hochregulierung der HMGCR erreicht wird. Dies hat eine Anhäufung von Mevalonat im Cytoplasma zur Folge, welches durch die MK-Defizienz dann nicht vollständig umgesetzt

werden kann, und nachfolgend zu einem erhöhten Plasmaspiegel führt (Houten, Frenkel, et al. 2003).

Die Fibroblasten wurden mit 50 μ M MCD-Cholesterol oder 50 μ M 25-HC inkubiert. Eine Western-Blot Analyse ist in Abb. 4.15 gezeigt.

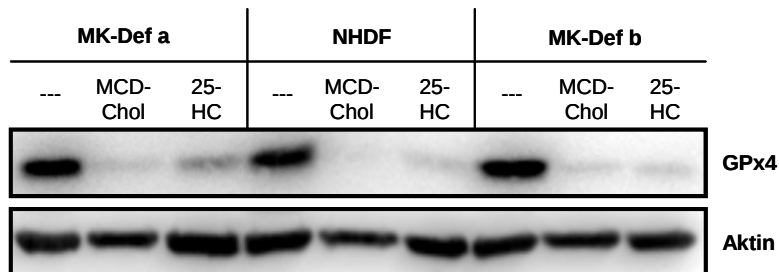


Abb. 4.15.: Einfluss von MCD-Cholesterol und 25-HC auf die Selenoproteinexpression in humanen Fibroblasten. Western-Blot Analyse von zwei unterschiedlichen Hautfibroblasten mit Mevalonatkinase Defizienz (MK-Def a und b) und Kontrollfibroblasten (NHDF). Gezeigt ist die GPx4-Expression von unbehandelten Zellen (---) und Zellen nach Inkubation mit 50 μ M MCD-Cholesterol (MCD-Chol) oder 25-Hydroxycholesterol (25-HC) über 4 d. Ein Antikörper gegen Aktin diente als Ladekontrolle.

In allen drei Fibroblastentypen war 25-HC in der Lage, die GPx4-Expression gegenüber den unbehandelten Zellen (---) deutlich zu senken. Dies zeigt, dass die Cholesterol-Selenoprotein-Kopplung nicht nur in klonalen Hepatozyten auftritt, sondern auch in primären humanen Zellen aus Biopsie-Material. Eine real-time RT-PCR Analyse der unbehandelten Fibroblasten zeigte eine erhöhte HMGCR-mRNA in den MK-defizienten Zellen gegenüber den NHDF-Zellen, was sich mit Beobachtungen aus der Literatur deckt (Haas and Hoffmann 2007). Die Inkubation mit 25-HC resultierte jedoch in einer Verminderung der HMGCR-mRNA in allen drei Zelltypen. Dies zeigt, dass 25-HC auch in Fibroblasten ein starker Suppressor der HMGCR ist, was in einer Verminderung der GPx4-Expression resultiert. MCD-Cholesterol hatte in diesen Fibroblasten ebenfalls einen suppressiven Effekt auf die GPx4, war also offensichtlich in diesen Fibroblasten zellgängig, im Gegensatz zu den HepG2-Zellen (Abb. 4.13).

4.4 Untersuchungen in transgenen Mausmodellen der Hypercholesterolämie

Um die mögliche in vivo-Relevanz des in humanen Hepatozyten und Fibroblasten gefundenen Zusammenhangs zwischen Cholesterol und Selenoproteinsynthese noch weiter zu untersuchen, wurden Experimente in zwei transgenen Tiermodellen der Hypercholesterolämie

durchgeführt. Dazu wurden zum einen eine LDL-Rezeptor-defiziente Mauslinie (LDL-R^{-/-}), zum anderen eine ApoE-defiziente Mauslinie (ApoE^{-/-}) herangezogen. Beide Mutanten weisen bei normaler Fütterung erhöhtes Serum-Cholesterol im Vergleich zum Wildtyp auf und gelten als die beiden klassischen und bestuntersuchten genetisch manipulierten Tiermodelle für ein erhöhtes Arteriosklerose-Risiko (Zhang et al. 1992; Ishibashi et al. 1994; Plump and Breslow 1995; Kuipers et al. 1996; Moghadasian et al. 2001; Meir and Leitersdorf 2004). Jeweils vier dieser Tiere und vier Kontroll-Mäuse (C57BL/6) wurden von der Firma „The Jackson Laboratory“, Maine, USA bezogen. Sämtliche Tiere waren männlich und acht Wochen alt ($\pm 3d$).

Die Gewebe von jeweils vier Exemplaren eines Genotyps wurden mittels Western-Blot auf Selenoproteine untersucht. Die entnommenen Organe wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Das Gewebe wurde zuerst mit PBS gewaschen, und Blut und Fellreste wurden abzentrifugiert. Anschließend erfolgte die Lyse in denaturierendem Lysepuffer (s. Kapitel 2.5) und ein mechanischer Aufschluss der Zellen. Grobe Gewebsreste wurden abzentrifugiert und die überstehende Fraktion zur Western-Blot Analyse verwendet (Abb. 4.16, A).

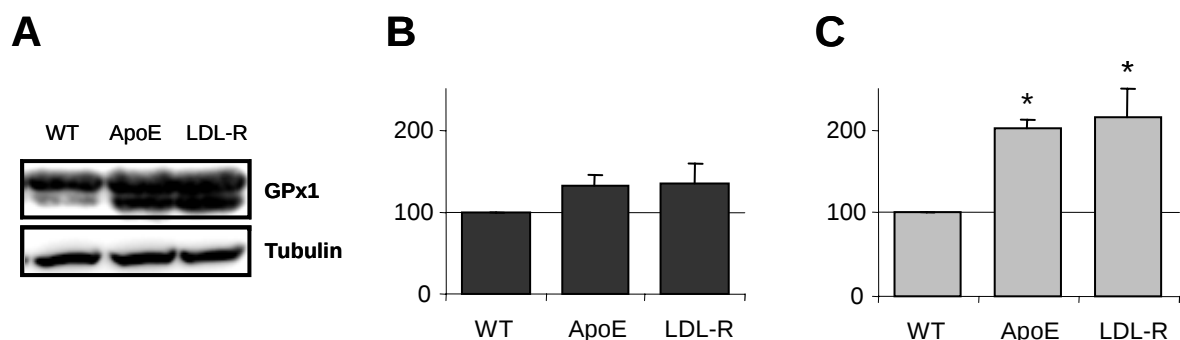


Abb. 4.16.: Western-Blot Analyse der Leber-GPx1 von ApoE- und LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen. (A) zeigt einen Western-Blot gegen GPx1 in Wildtyp-Mäusen (WT) und mutanten Mäusen, mit einer ApoE- bzw. LDL-Rezeptor-Defizienz. Ein Anti-Tubulin Antikörper diente als Ladekontrolle. (B-C) Auswertung der Doppelbande (Mittelwert $\pm$ S.D.) von 4 unterschiedlichen Tieren ($n=4$), (B) zeigt die obere, (C) die untere Bande. Sterne markieren eine Signifikanz gegenüber den wildtypischen Tieren (* $p<0,05$; One-Way ANOVA).

Die Western-Blot Analyse der Leber-GPx1 ergab eine Doppelbande (Abb. 4.16, A). Die stärkere, höhermolekulare Bande ist in Abb. 4.16, B quantifiziert, die darunter liegende, etwas schwächere Bande in Abb. 4.16, C. Bei beiden Mauslinien ist ein Anstieg beider Banden erkennbar, die etwas kleinere Bande (Abb. 4.16, C) steigt sogar hochsignifikant um ca. 100% an. Es ist unklar, weshalb im Leberhomogenat eine Doppelbande der GPx1 auftritt. GPx1 ist ein zytosolisches Protein, von dem keine weiteren Isoformen bekannt sind (Lei et al. 2007).

Auch eine Glycosylierung der GPx1 wurde bislang noch nicht beschrieben. Möglich wäre eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit einem verwandten Protein, wobei es sich jedoch nicht um die GPx4 handeln kann, da ein spezifischer Antikörper gegen dieses Protein keinen Unterschied zwischen Kontroll- und Knockout-Mäusen anzeigte.

Um dieses zunächst unerwartete Resultat zu erklären, wurde eine Analyse der Cholesterol-Level in der Leber durchgeführt. Beide Mauslinien sind zwar Modelle für erhöhtes Cholesterol im Blut und in der Peripherie, bezüglich des hepatischen Cholesterols finden sich jedoch widersprüchliche Angaben in der Literatur. In beiden Mauslinien sind Proteine dysfunktionell, die insbesondere die Wiederaufnahme von peripherem Cholesterol in die Leber, z.B. zur weiteren Ausscheidung über die Galle, vermitteln.

Die Analyse der juvenilen, männlichen Mäuse ergab einen deutlichen Unterschied im Leber-Cholesterolgehalt zwischen den Genotypen (Abb. 4.17). Die Knockout-Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrollmäusen eine signifikante Verringerung des freien Cholesterols (Abb. 4.17, A). Im Hinblick auf das Gesamt-Cholesterol (freies Cholesterol + Cholesterolester) wurde eine statistische Signifikanz auf Grund der relativ großen Variabilität knapp verfehlt (Abb. 4.17, B). In der Tat war also in den untersuchten juvenilen Mäusen eine erhöhte GPx1-Expression mit einem lokal erniedrigten Cholesterol assoziiert.

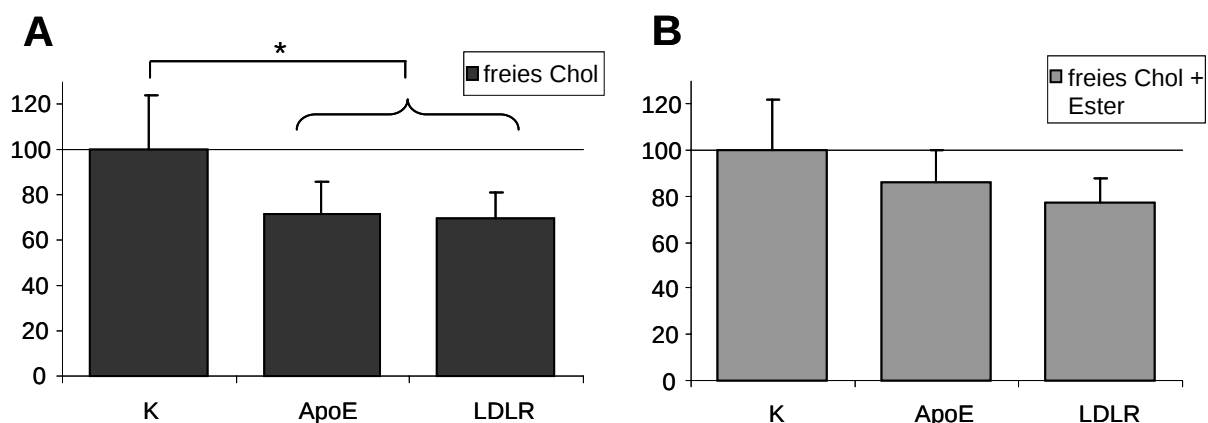


Abb. 4.17.: Messung des Leber-Cholesterols von ApoE- und LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen. Es wurden sowohl das freie Cholesterol (**A**) als auch das Gesamt-Cholesterol (freies Cholesterol + Cholesterolester) (**B**) von Wildtyp-Mäusen (WT) und mutanten Mäusen, mit einer ApoE- bzw. LDL-Rezeptor-Defizienz gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte ($\pm$ S.D.) von 4 unterschiedlichen Tieren ($n=4$). (* $p<0,05$; One-Way ANOVA).

Diese Ergebnisse decken sich weitgehend mit denen von Ishibashi et al. Diese Arbeitsgruppe analysierte die Cholesterolspiegel von ApoE^{-/-}, LDL^{-/-}-Mäusen und dem Doppelknockout (ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}) und konnte bei einer normalen Fütterung in 13 Wochen alten Tieren trotz einer massiven Hypercholesterolemie keinen signifikanten Anstieg im Leber-Cholesterol feststellen (Ishibashi et al. 1994).

Die in den mutanten Tieren erhöhten Cholesterolllevel im Plasma, aber erniedrigten Level in der Leber, liefern möglicherweise eine Erklärung für den starken Leber-GPx1-Anstieg. Die Leber der mutanten Mäuse ist nicht in der Lage, das im Plasma vorhandene Cholesterol aufzunehmen, wodurch die HMGCR nicht inhibiert wird und zu einer erhöhten Aktivität gelangt. Daraus entstehen vermehrt Isopreneinheiten, die zur Modifikation der Sec-tRNA herangezogen werden können. Die Folge davon wäre eine gesteigerte Selenoproteinexpression.

In gewissem Gegensatz dazu stehen allerdings die Ergebnisse von Kuipers et al. und Mahadasian et al. Diese beiden Arbeitsgruppen fanden bei ApoE^{-/-}-Mäusen ein erhöhtes Leber-Cholesterol und eine verminderte HMGCR-Aktivität (Kuipers et al. 1996; Moghadasian et al. 2001). Der Grund für die unterschiedlichen Messergebnisse der Arbeitsgruppen ist unklar, könnte aber durchaus in dem unterschiedlichen Alter der untersuchten Tiere zu finden sein. Im allgemeinen steigt auch in Knockout-Mäusen der Cholesterolgehalt mit dem Alter deutlich an.

Andere Gewebe wie Herz, Niere, Hoden, Muskel und Vollblut der oben beschriebenen Tiere wurden ebenfalls im Zuge dieser Arbeit auf ihre Selenoproteine untersucht. Dabei konnte aber kein Unterschied zwischen Wildtyp- und mutanten Mäusen gefunden werden. Warum ausgerechnet die Leber als einziges Organ eine erhöhte Selenoproteinexpression in den Knockout-Tieren aufweist, muss in weitergehenden Studien geklärt werden.

5 Diskussion

5.1 Statine sind potente Hemmstoffe der Selenoproteinsynthese

Bislang sind 25 Selenoproteine beim Menschen bekannt, die jedoch zum Teil nur wenig erforscht sind. Bekannte Vertreter der Selenoproteinklasse sind z.B. die Glutathionperoxidasen (GPx) und die Thioredoxin-Reduktasen (TRxR) (Gromer et al. 2005). Selenoproteine enthalten eine ungewöhnliche Aminosäure, Selenocystein, die enzymatisch auf der entsprechenden tRNA entsteht. Erst dann ist eine korrekte Translation der mRNA möglich. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass die Selenoproteinexpression von der Selenkonzentration abhängig ist (Abb. 4.2), wie auch in dieser Arbeit bestätigt werden konnte, und eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt (Abb. 4.1). In HepG2-Zellen konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression der GPx1 und GPx4 und der Selenkonzentration nachgewiesen werden (Abb. 4.2). Erst durch Selensupplementation sind beide Enzyme auf Western-Blot Ebene detektierbar. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Novoselov et al. konnten in transgenen Mäusen einen ähnlichen Zusammenhang zwischen der Leber-GPx1 und der Selenkonzentration feststellen (Novoselov et al. 2005). Saito et al. konnten eine Steigerung der Enzymaktivität von GPx1, GPx4 und TRxR durch Selensupplementation nachweisen, was zudem die Viabilität der Zellen erhöhte (Saito et al. 2003). Bermano et al. detektierten bei Ratten einen Anstieg der GPx1- und der GPx4-Aktivität in Leber und Herz durch Fütterung selenhaltiger Nahrung. Die GPx4-Aktivität in der Schilddrüse wurde durch diese Diät allerdings nicht beeinflusst (Bermano et al. 1995). Ebenso konnte die GPx4-Aktivität in arteriellen Endothelzellen von Rindern durch Se nicht beeinflusst werden (Hara et al. 2001), was auf eine gewebspezifische Hierarchie innerhalb der Selenoproteine hindeutet (Behne et al. 1988; Brigelius-Flohé 1999).

Die Expression vieler Selenoproteine scheint eine Modifizierung der Selenocystein-tRNA (Sec-tRNA) in Form einer Isopentenylisierung zu benötigen. Der Mevalonatpfad dient hauptsächlich zur Biosynthese von Cholesterol, liefert jedoch auch andere wichtige Produkte, wie z.B. Isoprenoide, die unter anderem für diese Modifikation verwendet werden können (Björk et al. 1987). Durch Anhängen einer Isopentenylgruppe an Adenosin 37 kann der Einbau der tRNA am UGA-Codon, welches normalerweise den Translationsstopp signalisiert, erfolgen (Warner et al. 2000; Moustafa et al. 2001).

Der Mevalonatpfad wird hauptsächlich durch die HMG-CoA-Reduktase (HMGCR) reguliert. Statine hemmen dieses Enzym reversibel und kompetitiv und finden daher typischerweise ihren Einsatz zur Reduktion des Cholesterols bei Hypercholesterolämie-Patienten.

Im Zuge dieser Arbeit konnte eine Unterdrückung der GPx4-Expression in humanen Leberzellen bei Verwendung von therapeutisch relevanten Konzentrationen (beginnend bei 10 - 100 nM) von drei unterschiedlichen Statinen, Atorvastatin, Cerivastatin und Lovastatin, gezeigt werden (Abb. 4.3 und 4.4). Die humanen Plasmakonzentrationen nach einer oral eingenommenen Einzeldosis von 40 mg Atorvastatin oder Lovastatin liegen bei 50 – 120 nM (Atorvastatin), bzw. 25 – 50 nM (Lovastatin). Cerivastatin, das ca. 20 mal potenter als Atorvastatin ist (Stark 2003) und daher in weitaus geringerer Dosis eingenommen wird (0,2 mg), weist ein maximales Plasmalevel von 5 nM auf (Corsini et al. 1999). Da HepG2-Zellen verschiedene Isoformen von Cytochrom P450 exprimieren, über die Statine hauptsächlich abgebaut werden (Westerink and Schoonen 2007), könnte es sein, dass die im Experiment wirksame Statinkonzentration sogar noch geringer war als die verabreichte Konzentration.

Alle drei verwendeten Statine waren in der jeweiligen Konzentration nicht nur in der Lage das Gesamtlevel an GPx4 zu reduzieren (Abb. 4.3), sondern auch die Neusynthese von GPx (Abb. 4.4). Diese konnte durch radioaktive Markierung mit ⁷⁵Se überprüft werden. Die TRxR blieb jedoch bei allen Statinbehandlungen weitgehend konstant. Grund dafür könnte die proteinspezifische Hierarchie innerhalb der Selenoproteine sein (Behne et al. 1988; Brigelius-Flohé 1999). Es scheint als wären die TRxR in Leberzellen privilegiert und würden trotz Statinbehandlung weiterhin exprimiert werden.

Neben den Proteinlevel wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Aktivität der GPx gemessen. GPx haben in der Zelle die Aufgabe, Peroxide abzubauen und damit zu detoxifizieren. Auf diese Weise verringern sie den oxidativen Stress und gewährleisten ein Überleben der Zelle. Es zeigte sich, dass HepG2-Zellen durch Statininkubation die Fähigkeit verlieren, tert-Butylhydroperoxid (t-BuOOH), ein Substrat der GPx, abzubauen, was an einer verminderten GPx-Aktivität lag (Abb. 4.5, A). Die Glutathionlevel wurden durch Statininkubation kaum beeinflusst (Abb. 4.5, B). Zwar konnte bei 1 µM Cerivastatin ein starker Abfall an Glutathion beobachtet werden, jedoch ist diese Statinkonzentration so hoch, dass sich hier bereits toxische Eigenschaften dieser Substanz bemerkbar machten.

Im Zuge dieser Arbeit konnte die GPx nach Statinbehandlung außer durch Mevalonat nur durch das Isoprenoid Geranylgeraniol zum Teil wieder hergestellt werden (Abb. 4.8). Mevalonat stellt eine Vorstufe für Isoprenoide dar, welche für die Modifikation der Sec-tRNA

verwendet werden können. Geranylgeraniol, ebenfalls ein aus Isopreneinheiten bestehendes Zwischenprodukt des Mevalonatpfades, konnte in verschiedenen Zellentypen die durch Lovastatin und Mevastatin induzierte Apoptose signifikant verringern (Zhong et al. 2003; Campia et al. 2009). Die Inkubation mit dieser Substanz hatte dort keinerlei Einfluss auf die Cholesterolsynthese und war effektiver als eine Behandlung mit Ubichinon (CoQ), ein wichtiges isoprenhaltiges Substrat der mitochondrialen Atmungskette, das oft als Antioxidans eingesetzt wird (Campia et al. 2009). Geranylgeraniol wirkt also über verschiedene Mechanismen auf das Zellüberleben ein und könnte somit indirekt eine Auswirkung auf die Selenoproteinsynthese gehabt haben.

Die Wirkung der Statine auf Selenoproteine erfolgt auf translationaler Ebene (Abb. 4.7, A-C). Sowohl Atorvastatin, als auch Cerivastatin und Lovastatin hatten einen induktiven Einfluss auf die HMGCR, jedoch wurde die Transkription der GPx1 und GPx4 kaum beeinflusst. Somit erhärtet sich der Verdacht, dass Statine die Selenoproteinexpression unterdrücken, indem sie die nötigen Isopreneinheiten für die post-transkriptionelle Modifikation der Sec-tRNA, die Isopentenylisierung von A37, vermindern. Bleibt diese Modifikation aus, resultiert dies in einer reduzierten Translation der Selenoprotein-mRNA.

Das Schaubild in Abb. 5.1 zeigt ein Schema über den Zusammenhang zwischen Statinen und der Selenoproteinsynthese. Statine inhibieren nicht nur die Cholesterolsynthese, sondern auch die Expression von Selenoproteinen auf post-transkriptioneller Ebene, indem sie die Produktion von Isoprenoiden verhindern, die für eine Modifikation der Sec-tRNA nötig wären.

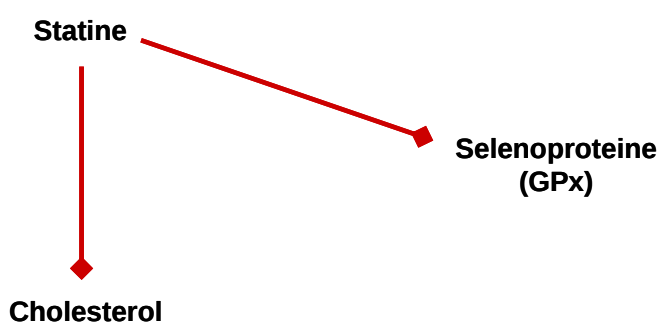


Abb. 5.1.: Einfluss der Statine auf die Selenoproteinsynthese. Rote Linien bedeuten Inhibition. Erläuterungen siehe Text.

5.2 Die klinischen Nebenwirkungen der Statine auf Leber und Muskulatur werden wahrscheinlich durch eine Blockade der Selenoproteinsynthese ausgelöst

Statine verringern signifikant das Risiko von kardio- und cerebrovaskulären Krankheiten, hauptsächlich durch Senkung des LDL-Cholesterols (Amarenco and Labreuche 2009). Darüber hinaus zeigen Statine sogenannte pleiotrope Effekte die unabhängig von der cholesterolsenkenden Wirkung sind. Ein Beispiel dafür wäre die Unterdrückung der Isoprenoid-Biosynthese, die z.B. als Membrananker für kleine GTPasen dienen (Rung et al. 2006; Wang et al. 2008), zur Modifikation der Sec-tRNA herangezogen werden oder Ausgangsverbindung für die Synthese von mitochondrialem Ubichinon (Coenzym Q, CoQ) darstellen. Bis heute ist nicht vollständig geklärt, durch welchen Mechanismus die Statine ihre positiven klinischen Eigenschaften verwirklichen. Es wird vermutet, dass nur ein Teil davon auf die Senkung von Cholesterol zurückzuführen ist (Mascitelli et al. 2009). Ebenso unklar ist, wodurch die unerwünschten Nebenwirkungen der Statine ausgelöst werden. Eine Erhöhung der Leber-Transaminasen ist eine der häufigsten Begleiterscheinungen dieses Medikamententyps (Bays 2006). Bei hoher Statindosis sind Nebenwirkungen, welche die Muskeln betreffen, nicht selten (Bruckert et al. 2005; Laaksonen et al. 2006; Tsujimoto et al. 2006; Sathasivam and Lecky 2008), wobei im schlimmsten Fall auch der Herzmuskel betroffen sein kann (Sodha et al. 2008). Ein Grund für diese statininduzierte Nebenwirkung wäre möglicherweise, dass eine Hemmung der HMGCR zu einer verminderten Selenoproteinexpression führt. Es gibt Hinweise, die dafür sprechen würden. So ähnelt eine statininduzierte Myopathie Selenmangelkrankheiten wie z.B. der Keshan-Krankheit (Moosmann and Behl 2004a). Shrimali et al. konnten zeigen, dass Selenoproteine essentiell für die Entwicklung von Endothelzellen und für die Funktion des Herzmuskels sind (Shrimali et al. 2007). Viele Selenoproteine sind in den Abbau von oxidativem Stress involviert. Eine statininduzierte Verminderung der Expression wichtiger Verteidigungsenzyme wie der GPx würde die Zellen anfälliger für oxidativen Stress machen, was weitreichende Konsequenzen für verschiedene Organe, insbesondere die Leber mit ihrem vielfältigen oxidativen Stoffwechselwegen haben könnte.

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Statine in der Lage sind die Selenoproteinexpression zu unterdrücken. Durch Inkubation der Leberzellen mit Atorvastatin oder Cerivastatin konnte ein Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gemessen werden (Abb. 4.5, C). Der Grund für den ROS-Anstieg könnte dadurch erklärt sein, dass durch die Statininkubation die Expression von Proteinen wie der GPx vermindert wird (Abb.

4.3 und 4.4). Esposito et al. konnten in GPx1-defizienten Mäusen einen signifikanten Anstieg an Wasserstoffperoxid (H_2O_2) messen, insbesondere in der Leber (Esposito et al. 2000). Ebenso konnten Lankin et al. eine statininduzierte verstärkte Lipidoxidation in Form von oxidiertem Low-Density-Lipoprotein (LDLox) bei hypercholesterolämischen Patienten messen (Lankin et al. 2003).

Durch Statinbehandlung sinkt die Fähigkeit der Zellen, sich gegen Peroxide zu verteidigen, was zu einer Erhöhung von ROS und schließlich auch zu einer verminderten Viabilität der Zellen führt. Dies wird besonders deutlich, wenn Zellen nach Statininkubation zusätzlichen Stressoren ausgesetzt werden. Abb. 4.6 (A-D) zeigt, dass statinbehandelte Zellen ihre Fähigkeit verlieren sich gegen äußere Stressoren wie t-BuOOH zu verteidigen, was zu einer Verringerung ihrer Viabilität führt. Die Vermutung liegt nahe, dass der Grund für den Vitalitätsverlust in einer Verminderung der Selenoproteinsynthese liegt, da dieser Effekt teilweise durch Selensupplementation revertiert werden konnte. Die Zugabe von Selen hatte auch eine Steigerung der GPx4 zur Folge, jedoch war die Expression bei statinbehandelten Zellen etwas niedriger als bei unbehandelten Zellen (Abb. 4.6, E).

GPx1-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber oxidativen Stress-induzierenden Substanzen wie Paraquat, Diquat und Wasserstoffperoxid (de Haan et al. 1998; Fu et al. 1999). Ebenso führen therapeutische Dosen Pitavastatin in menschlichen vaskulären Muskelzellen zu verstärkter Apoptose, wenn diese mit Wasserstoffperoxid behandelt werden. Durch Inhibition der GPx steigt der oxidative Stress innerhalb der Zelle. Bei Mäusen führte ein Knockout des Sec-tRNA Gens in der Leber zu Leberversagen und schließlich zum Tod, allerdings erst im Alter von drei bis 24 Wochen. Bis zu diesem Zeitpunkt entwickelten sich die Tiere normal, konnten also den Verlust der Selenoproteine kompensieren (Carlson et al. 2004). Suzuki et al. konnten zeigen, dass ein konditioneller Knockout des Sec-tRNA Gens in Makrophagen oder in der Leber zu einer transkriptionellen Induktion von Targetgenen des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor-like 2 (Nrf2) führt (Suzuki et al. 2008). Zu diesen Targetgenen gehören unter anderem die Hämoxxygenase 1 (HO1) (Rushworth et al. 2005) und die NAD(P)H-Chinon Oxidoreduktase 1 (NQO) (Jaiswal et al. 1988). Ein Leber-spezifischer Doppel-Knockout von Sec-tRNA und Nrf2 führte zu einer enormen Steigerung des oxidativen Stresses und verstärkter Apoptose (Suzuki et al. 2008).

Nach Behandlung mit Atorvastatin oder Cerivastatin konnte in der vorliegenden Arbeit eine Induktion des HO1- und NQO-Gens detektiert werden (Abb. 4.7, D). Dieses Ergebnis ist im Einklang mit den bisher erzielten Ergebnissen. Atorvastatin und Cerivastatin führen zu einer deutlichen Verringerung der GPx-Expression und -Aktivität in humanen HepG2-Zellen, und

erhöhen das Ausmaß an ROS innerhalb der Zelle, was letztendlich zu einer vermehrten Transkription anderer Verteidigungsmechanismen führt, um das Überleben der Zelle zu sichern. Der erhöhte oxidative Stress, ausgelöst durch die statininduzierte Unterdrückung bestimmter Selenoproteine, könnte eine Erklärung für die klinischen Nebenwirkungen der Statine liefern.

Die Gründe für statininduzierte Nebenwirkungen sind stark umstritten. Es gibt Arbeitsgruppen, die andere pleiotrope Effekte dieser Substanzklasse hierfür verantwortlich machen. Die im Mevalonatstoffwechsel anfallenden Isoprenoide werden nicht nur zur Modifikation der Sec-tRNA eingesetzt, sondern dienen z.B. auch als Membrananker für kleine GTPasen, wodurch diese aktiviert werden und wichtige Funktionen bei der Signaltransduktion übernehmen. Desweiteren dienen einige Isoprenoide als Ausgangsverbindung für die Synthese von Ubichinon (Coenzym Q, CoQ), ein essentieller Faktor der mitochondrialen Atmungskette. Lankin et al. konnten bei Patienten unter Pravastatinbehandlung über 6 Monate eine Akkumulation von Lipidperoxiden feststellen. Bei gleichzeitiger Behandlung mit CoQ verringerte sich jedoch das Lipidperoxidlevel (Lankin et al. 2003). Weiterhin konnte in einer Studie von Fedacko et al. die Statin-induzierte Myopathie durch Verabreichung von CoQ signifikant reduziert werden. In der gleichen Studie half eine orale Selen supplementation nicht gegen die Muskelbeschwerden (Fedacko et al. 2009). Bei einer ähnlichen Studie konnte jedoch die Myopathie, ausgelöst durch Atorvastatin, weder durch Selen noch durch CoQ gemildert werden (Bogsrud et al. 2009). Es gibt jedoch auch Studien, die die Selenoprotein-Hypothese unterstützen. Z.B. konnten Pella et al. zeigen, dass die statininduzierten Myopathien durch Gabe von Selen drastisch minimiert werden konnten (Pella et al. 2008).

Die Frage, ob Patienten unter Statinbehandlung gleichzeitig Selen verabreicht werden sollte, um die störenden Nebenwirkungen zu verringern, wird somit kontrovers diskutiert. Die Ergebnisse in dieser Arbeit, sowie einige erste klinische Studien, unterstützen diesen Ansatz. Jedoch sind sicherlich weitere Versuche und Patientenstudien nötig, um in dieser Frage zu einer tragfähigen Therapieempfehlung zu gelangen.

5.3 Cholesterol wirkt in ähnlicher Weise wie Statine inhibitorisch auf die Selenoproteinsynthese

Der Mevalonatstoffwechsel kann auf verschiedenen Wegen reguliert werden. Neben einer Hemmung durch bestimmte Pharmaka wie Statine wird die Cholesterolsynthese auch

durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus inhibiert. Somit ist Cholesterol in der Lage, seine eigene Synthese zu unterdrücken (Schoenheimer and Breusch; Goldstein and Brown 1990; Goldstein et al. 2006; Espenshade and Hughes 2007). Aber nicht nur reines Cholesterol, sondern auch in Form von Low-Density-Lipoprotein (LDL) (Brown et al. 1973) und 25-Hydroxycholesterol (25-HC) ist es in der Lage, die HMGCR zu inhibieren (Björkhem 2002; Adams et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte die GPx4- und die Selp-Expression in HepG2-Zellen durch 25-HC signifikant reduziert werden (Abb. 4.9, A und B). Somit zeigt sich 25-HC als ähnlich effektiver Inhibitor der Selenoproteinsynthese, wenngleich auch höhere Konzentrationen im Vergleich zu Statinen vonnöten sind.

Außer dem zellpermeablen Hydroxysteroid 25-HC war auch isoliertes humanes LDL in der Lage, die GPx4 zu unterdrücken (Abb. 4.10, A und C). Der Zustand des LDL-Cholesterols schien einen entscheidenden Einfluss auf die Selenoproteinexpression zu haben. LDL ist bei falscher oder längerer Lagerung leicht oxidierbar. Die Oxidation führt zur Bildung verschiedener cytotoxischer Produkte, unter anderem 7 β -Hydroperoxycholesterol (Hessler et al. 1983; Colles et al. 1996). Es existieren mehrere Publikationen, die eine positive Wirkung von Selenoproteinen auf LDL-induzierten oxidativen Stress belegen. Eine Selendepletion in Ratten führte zur Anreicherung von LDL in den Gefäßwänden, was in einer Schädigung des Gewebes resultierte (Huang et al. 2002). GPx1-Knockout Mäuse zeigten wiederum eine Erhöhung der LDL-Oxidation verbunden mit verstärkter Apoptose (Guo et al. 2001). Traulsen et al. zeigten, dass Selp in der Lage ist, LDL vor Oxidation zu schützen und somit der oxidative Stress reduziert werden kann (Traulsen et al. 2004).

Die TRxR1 scheint in diesem Zusammenhang eine Sonderstellung einzunehmen. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Enzym durch oxidiertes LDL induziert, sowohl auf Protein- (Abb. 5.10, A und B) als auch auf mRNA-Ebene (Abb. 5.14, B). Dieses Ergebnis wurde von Furman et al. und Hägg et al. durch Arbeiten in Makrophagen bestätigt (Furman et al. 2004; Hägg et al. 2006). Furman et al. fanden ebenfalls eine Erhöhung der TRxR1-mRNA und -Proteinmenge mit steigender Menge an oxidiertem LDL, jedoch nicht mit nativem LDL. Die Arbeitsgruppe erklärte dieses Phänomen mit dem Vorhandensein eines Elements in der Nähe des Promotors von TRxR1, das auf den Phospholipid-Anteil im oxidierten LDL reagiert und somit die Transkription dieses Gens steigert (Furman et al. 2004). Deswegen wurde in der vorliegenden Arbeit ein Aliquot von nativem humanen LDL aus frisch gewonnenem Vollblut aufgereinigt und untersucht (Abb. 4.11). Mit diesem Aliquot wurde nur noch eine sehr geringfügige Induktion der TRxR1 erzielt (Abb. 4.12). Diese Beobachtungen lassen sich so

interpretieren, dass oxidierte Metabolite im oxidierten LDL für den Anstieg der TRxR1 verantwortlich sind, was sich auch mit Befunden aus der Literatur deckt (Furman et al. 2004). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass TRxR1 das Selenoprotein ist, welches in Leberzellen hauptsächlich in die Verteidigung gegen oxidiertes LDL involviert ist.

Damit muss das Schaubild in Abb. 5.1 über die Regulation der Selenoproteinexpression erweitert werden. Abb. 5.2 zeigt das Schaubild unter Einbeziehung von Cholesterol. Nicht nur Statine inhibieren die Synthese der stress-induzierbaren Selenoproteine wie GPx, sondern auch Cholesterol, insbesondere Cholesterolderivate wie 25-Hydroxycholesterol. Diese Hemmung erfolgt nach einem post-transkriptionellen Mechanismus. Oxidierte Bestandteile des oxidierten LDL führen in der Zelle zu einer spezifischen, transkriptionellen Induktion des Selenoproteins TRxR.

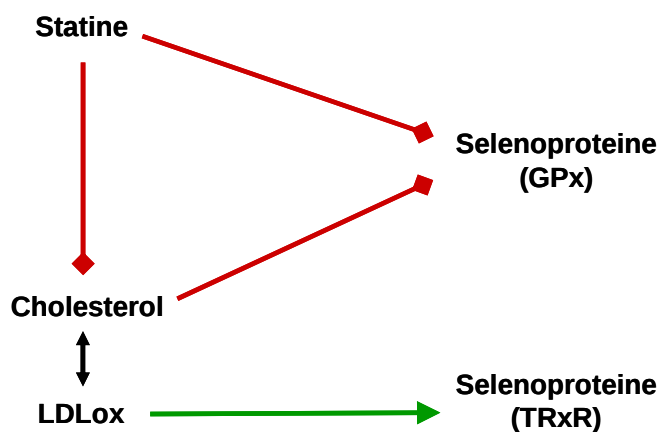


Abb. 5.2.: Regulation der Selenoproteinsynthese unter Einfluss von Statinen und Cholesterol. Rote Linien bedeuten Inhibition, grüne Pfeile Induktion. Erläuterungen siehe Text.

Das vereinfachte Schaubild in Abb. 5.2 spiegelt das in der vorliegenden Arbeit beobachtete Beziehungsgeflecht des aus drei Komponenten bestehenden Systems der Regulation der Selenoproteine wider. Statine inhibieren diese direkt, sie inhibieren aber gleichzeitig die Synthese eines äußerst potenten, endogenen Inhibitors, des Cholesterol. Letzteres könnte sich in vivo auch in einer Stimulation der Selenoproteinsynthese niederschlagen, in bestimmten Konzentrationsbereichen der beteiligten Partner. Das Endergebnis eines solchen Drei-Komponenten-Systems lässt sich qualitativ nicht vorhersagen. Es besteht somit durchaus die Möglichkeit, dass ein Teil der klinischen positiven Wirkungen der Statine in der Aufhebung der Cholesterolblockade der Selenoproteinsynthese besteht. Dies könnte bei niedrigen Statindosen relevant sein.

Um dem Einfluss von Cholesterol auf die Selenoproteinsynthese zu untermauern wurden einige Versuche in primären humanen Hautfibroblasten wiederholt. Dabei kamen Kontrollfibroblasten und Biopsien von Mevalonat-Kinase-defizienten Patienten zum Einsatz. Die Mevalonat-Kinase (MK) katalysiert die Umsetzung des durch die HMGCR entstandenen Mevalonats zu Phosphomevalonat. Eine MK-Defizienz führt trotz der gesenkten Aktivität dieses Enzyms nicht zur Verringerung von Cholesterol, Isoprenoiden oder Lipoproteinen (Houten, Frenkel, et al. 2003). Jedoch ist eine gesteigerte Aktivität der HMGCR bemerkbar (Haas and Hoffmann 2007), wodurch diese Zellen eine Ähnlichkeit zu Zellen unter Statinbehandlung aufweisen. Ein Unterschied in der basalen Selenoproteinsynthese zwischen MK-defizienten- und Kontrollzellen konnte jedoch in früheren, eigenen Versuchen nicht detektiert werden.

Eine Inkubation mit 25-HC hatte einen suppressiven Effekt auf die GPx4, sowohl in Kontrollzellen als auch in MK-defizienten Zellen (Abb. 4.15). Dies entspricht den Ergebnissen aus den humanen Leberzellen. Auffallend ist jedoch, dass MCD-Cholesterol den gleichen Effekt hatte, wogegen diese Substanz in HepG2-Zellen keinerlei Auswirkungen hatte. Dies lässt sich wahrscheinlich auf eine fehlende Zellgängigkeit von MCD-Cholesterol in HepG2-Zellen zurückführen, da in diesen Zellen auch kein Einfluss von MCD-Cholesterol auf die HMGCR-Transkription festzustellen war. Houten et al. detektierten eine Absenkung der HMGCR-Aktivität, wenn MK-defiziente Hautfibroblasten mit verschiedenen Isoprenoiden oder einer Mixtur aus 25-HC und Cholesterol inkubiert wurden (Houten, Schneiders, et al. 2003). Eine RT-PCR Analyse im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergab ebenfalls eine Verminderung der HMGCR-mRNA durch Inkubation mit 25-HC, und zwar sowohl in den Kontrollzellen als auch in den MK-defizienten Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Cholesterol-induzierte Verminderung der HMGCR-Aktivität würde wiederum die reduzierte Expression der GPx4 erklären. Die Regulation der Selenoproteine ist äußerst komplex und gewebsspezifisch. Einige Gewebe reagieren empfindlicher auf Selschwankungen als andere (Burk et al. 1972; Behne et al. 1988; Brigelius-Flohé 1999). Somit ist es nicht verwunderlich, dass einige Gewebe auch empfindlicher auf Suppressoren des Mevalonatpfades reagieren, wie dies bei Fibroblasten im Vergleich zu HepG2-Zellen der Fall zu sein scheint.

Die in den Hepatocyten und Fibroblasten gefundenen Zusammenhänge zwischen dem Cholesterolmetabolismus und der Selenoproteinsynthese sollten in einem Tiermodell weiter untersucht werden. Es existieren inzwischen mehrere Publikationen die einen Zusammenhang zwischen einer Selendefizienz und Hypercholesterolämie, bzw. den daraus entstehenden

vaskulären Krankheiten sehen. Familiäre Hypercholesterolämie (FH) kann durch einen Defekt im LDL-Rezeptor-Gen hervorgerufen werden, oder auch durch einen Defekt in einem Liganden dieses Rezeptors, dem Apolipoprotein E (ApoE). Ist dieser Rezeptor defekt, können die mit Cholesterol beladenen Partikel nicht von der Leber aufgenommen werden und verbleiben somit im Plasma. Bei einer ApoE-Defizienz werden ApoE-haltige Lipoproteine vom LDL-Rezeptor nicht erkannt und verbleiben ebenfalls im Plasma. In beiden Fällen führt dies zur Akkumulation von Cholesterol im Gewebe, wodurch letztlich eine Arteriosklerose entstehen kann (Ishibashi et al. 1994).

Viele europäische Studien belegen einen protektiven Effekt von Selen auf kardiovaskuläre Krankheiten (Steinbrenner and Sies 2009). Dhingra et al. konnten zeigen, dass sich eine Selensupplementation bei Ratten negativ auf die Aktivität der HMGCR auswirkt und somit die Biosynthese von Cholesterol unterdrückt wird. Im gleichen Zug wird dadurch auch die Menge an Apolipoprotein B (ApoB) verringert, wodurch der LDL-Spiegel ebenfalls sank (Dhingra and Bansal 2006a). In einer anderen Arbeit dieser Gruppe konnte die Aktivität des LDL-Rezeptors sowie seine Transkription durch Fütterung von Selen signifikant gesteigert werden (Dhingra and Bansal 2006b). Eine Mutation der Sec-tRNA an A37 (A37→G37) und U34 (U34→A34), den Stellen der tRNA, die normalerweise post-transkriptionelle Modifikationen erfahren, führte zur verringerten Expression von stressbezogenen Selenoproteinen, wie z.B. der GPx, aber nicht von Sec-haltigen Haushaltsproteinen, wie z.B. die TRxR (Carlson et al. 2005). Ein Knockout der Sec-tRNA in der Leber hingegen führte zum vollständigen Verlust aller Selenoproteine, wodurch die Hepatocyten schließlich zugrunde gingen (Carlson et al. 2004). Der Knockout ging einher mit erhöhten Cholesterolkonzentrationen im Plasma sowie einem erhöhten Level an ApoE. Zusätzlich erfolgte eine verstärkte Transkription der Gene, die in die Cholesterolbiosynthese involviert sind. Gene, die mit dem Cholesterolmetabolismus und -Transport assoziiert sind, wurden dagegen vermindert transkribiert. Bei der genetischen Manipulation der Sec-tRNA (G37, A34) waren jedoch keine Änderungen im Cholesterol- oder ApoE-Spiegel zu finden (Sengupta et al. 2008). Ein weiterer Zusammenhang zwischen Selenoproteinen und Arteriosklerose liefern Guo et al. Die Arbeitsgruppe konnte in ApoE^{-/-}-Mäusen durch Überexpression von GPx4 die arteriosklerotischen Läsionen durch Abbau von Lipidperoxiden signifikant verringern (Guo et al. 2008).

Um den Status von Selenoproteinen bei Hypercholesterolämie zu überprüfen, wurden zwei Mausmodelle, LDL-R^{-/-} und ApoE^{-/-}, herangezogen. Beide Genotypen weisen erhöhte Cholesterolspiegel im Plasma auf und entwickeln im Laufe ihres Lebens arteriosklerotische

Plaques (Ishibashi et al. 1994; Plump and Breslow 1995; Kuipers et al. 1996; Moghadasian et al. 2001; Meir and Leitersdorf 2004).

Verschiedene Gewebe junger männlicher Tiere auf normalem Futter wurden auf ihre Selenoproteine hin untersucht. Die Leber war jedoch das einzige Organ, das hinsichtlich der GPx1 einen Unterschied zwischen Kontrollen und mutanten Mäusen aufwies (Abb. 4.16). Der Western-Blot zeigte eine Doppelbande, die eine stärkere Expression der GPx1 in LDL-R^{-/-}- und ApoE^{-/-}-Mäusen verdeutlichte. Dabei war sowohl bei der oberen (Abb. 4.16, B) als auch bei der unteren (Abb. 4.16, C) Bande eine Steigerung der GPx1 ersichtlich.

Es ist unklar, weshalb der verwendete Antikörper eine Doppelbande anzeigte, da von GPx1 keine weiteren Isoformen bekannt sind (Lei et al. 2007). Auch eine Kreuzreaktion mit GPx4 kann ausgeschlossen werden, da ein Antikörper gegen GPx4 keine Unterschiede zwischen Kontrollen und mutanten Tieren anzeigte. Die GPx3 ist ein sekretorisches Protein, welches hauptsächlich im Plasma zu finden ist, und die GPx6 ist nur im Riechepithel exprimiert. Daher kann hier eine Detektion dieser Proteine ausgeschlossen werden. Denkbar wäre jedoch eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit GPx2. Dieses Protein ist in der Leber und im Gastrointestinaltrakt zu finden, allerdings ist über dieses Protein nur sehr wenig bekannt (Gromer et al. 2005).

Die überraschenderweise gesteigerte Expression der GPx1 in der Leber der Knockout-Tiere lässt sich anhand der Cholesterol-Messungen in der Leber erklären (Abb. 4.17). Sowohl die LDL-R^{-/-}- als auch die ApoE^{-/-}-Mäuse hatten geringere Konzentrationen an Gesamt-Cholesterol (Cholesterol + Cholesterolester) und freiem Cholesterol in der Leber im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Dies könnte in den mutanten Tieren zu einer höheren Aktivität der HMGCR geführt haben, was eine gesteigerte Selenoproteinexpression erklären könnte.

In vielen anderen Studien über die Cholesterollevel von entsprechenden transgenen Mäusen wurden erhöhte Werte detektiert. Allerdings wurden dort in der Regel ältere Tiere oft auf cholesterolsupplementiertem Futter untersucht. Beispielsweise wurde von Kuipers et al. in ApoE^{-/-}-Mäusen sowohl eine Erhöhung des Plasma- als auch des Leber-Cholesterols detektiert (Kuipers et al. 1996).

Weshalb in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Western-Blots die GPx1 als einziges Selenoprotein von dem erniedrigten Cholesterollevel und der mutmaßlichen Aktivitätssteigerung der hepatischen HMGCR profitierte ist bislang unklar. Dennoch deuten die hier erzielten Ergebnisse in den LDL-R^{-/-}- und ApoE^{-/-}-Mäusen, sowie verschiedene Publikationen auf einen Zusammenhang zwischen Hypercholesterolämie und Selenoproteinen

hin. Ob eine Reduktion des Arteriosklerosisrisikos bzw. arteriosklerotische Läsionen durch eine Steigerung der Selenoproteinexpression bei unverändertem Cholesterol möglich wäre, muss in der Zukunft weiter untersucht werden.

5.4 Die vielfältigen negativen Auswirkungen eines erhöhten Cholesterolspiegels erklären sich möglicherweise mit einer daraus resultierenden generalisierten Hemmung der Selenoproteinsynthese

Cholesterol ist nach der vorherrschenden, jedoch auch umstrittenen biomedizinischen Meinung einer der kritischsten molekularen Parameter für die Vorhersage eines erhöhten Gesundheitsrisikos. Hierbei hat sich das Spektrum an Krankheiten, die von einem erhöhten Cholesterolspiegel im Blut oder in bestimmten Geweben möglicherweise negativ beeinflusst werden, in den letzten Jahren stark erweitert, und umfasst nun nicht nur den Komplex der kardiovaskulären Krankheiten wie Arteriosklerose (Levine et al. 1995; Moosmann and Behl 2004b; Steinberg 2006), sondern auch neurodegenerative Krankheiten wie die Alzheimersche Krankheit (AD) (Reid et al. 2007) und die Parkinsonsche Krankheit (Hu et al. 2008). Trotz seiner Essentialität für eine Vielzahl biochemischer Prozesse haftet Cholesterol der Ruf an, im adulten menschlichen Organismus den Charakter eines „Schadstoffs“ zu besitzen. Diese häufig geäußerte Schlussfolgerung stützt sich vor allem auf die überraschende Beobachtung, dass die forcierte Senkung des Cholesterolspiegels im Blut auch in Patienten mit nach klassischer Auffassung „normalem“ Cholesterolspiegel unter vielen Bedingungen positive gesundheitliche Auswirkungen mit sich zu bringen scheint, beispielsweise bei Patienten mit bereits gesicherter koronarer Herzerkrankung (Nissen et al. 2005; Wiviott and Cannon 2006). Im Widerspruch zu der großen Bedeutung, die Cholesterol für die generelle Physiologie der Zelle und auch für die Funktionalität ganzer Organe wie des Gehirns besitzt (Hennekam 2005; Mulder 2009), steht das Unwissen um die Mechanismen, welche langfristig jene potentiell negativen Folgen vermitteln (Levine et al. 1995; Maxfield and Tabas 2005). Z.B. ist es gegenwärtig völlig unverstanden, warum sich Cholesterolsteigerungen im Blutplasma letztendlich überhaupt negativ auf Organe wie das Gehirn auswirken sollten (Wolozin 2004; Whitmer et al. 2005), da nach heutigem Wissen der Cholesterolmetabolismus des Gehirns autark von demjenigen des restlichen Organismus zu sein scheint, sowohl in biosynthetischer wie degradativer Hinsicht (Mulder 2009).

Eine mögliche Erklärung für die negativen Auswirkungen eines erhöhten Cholesterolspiegels auf den Organismus könnte die Unterdrückung der Selenoproteinsynthese darstellen. Ein erhöhter Cholesterolspiegel scheint offensichtlich einen negativen Einfluss auf

stressinduzierte Selenoproteine wie die GPx zu haben, gleichzeitig können durch oxidierte Lipidmetabolite die TRxR als Verteidigungsmechanismus induziert werden (s. Kapitel 5.3).

Eine protektive Wirkung bestimmter Selenoproteine auf kardiovaskuläre Krankheiten wurde bislang nicht nur im Tiermodell (Guo et al. 2008), sondern auch in Patientenstudien gezeigt. Mehrere europäische Studien belegen eine positive Wirkung von Selen bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Steinbrenner and Sies 2009). Blankenberg et al. zeigten, dass eine gesteigerte GPx1-Aktivität mit einem reduzierten Risiko einer kardiovaskulären Krankheit korreliert (Blankenberg et al. 2003).

Neuere Untersuchungen zeigten einen protektiven Einfluss von Selen bzw. Selenoproteinen auf neurodegenerative Erkrankungen wie z.B. die Alzheimersche Krankheit (AD). Im Gehirn steigt SelP mit dem Alter an und ist besonders stark in AD-Patienten exprimiert (Bellinger et al. 2009). Im Gegensatz dazu sind die Plasma-Level von AD-Patienten erniedrigt (Cardoso et al. 2010). Das Gehirn nimmt jedoch im Selenmetabolismus eine Sonderstellung ein. Im murinen Gehirn werden 24 Selenoproteine exprimiert, was die Wichtigkeit dieser Enzyme für dieses Organ verdeutlicht. Ebenso wird dort auch bei Selenmangel die Konzentration dieses Spurenelements konstant gehalten (Zhang et al. 2008). Es ist gut etabliert, dass oxidativer Stress im Gehirn neurodegenerative Krankheiten begünstigt (Schweizer et al. 2004). Gwon et al. konnten zeigen, dass eine Selensupplementation die Produktion von toxischen Amyloid- β - (A β) Fragmenten, welche als Ursache für eine Alzheimersche Demenz gelten, verringern kann (Gwon et al. 2010). Speziell SelP wird für die Verteidigung gegen oxidativen Stress im Gehirn und A β -Plaques verantwortlich gemacht (Steinbrenner et al. 2006; Bellinger et al. 2008). Somit liegt der Verdacht nahe, dass die Neurodegeneration, ausgelöst durch einen erhöhten Cholesterolspiegel im Gehirn, von einer reduzierten Selenoproteinsynthese und damit vermehrtem oxidativen Stress herrührt.

Ein erhöhter Cholesterolspiegel gilt als Risikofaktor für viele Krankheiten vaskulärer oder neurodegenerativer Natur. Krankheiten dieser Art zählen zu den häufigsten Todesursachen in Industrieländern und erfordern dringend genauere Untersuchungen. Die vorliegende Arbeit liefert eine mögliche Erklärung für die Ursache der negativen Auswirkungen einer Hypercholesterolämie, nämlich die Hemmung der Selenoproteinsynthese und dem damit zusammenhängenden verminderten Abbau von oxidativem Stress. Weitere Experimente und vor allem Patientenstudien sind jedoch nötig, um diese These zu untermauern.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss des Mevalonatpfads auf die Expression von Selenoproteinen untersucht werden. Im Mevalonatpfad, einem universellen Stoffwechselweg eukaryontischer Zellen, entstehen neben Cholesterol auch verschiedene Isoprenoide, die z.B. für die post-transkriptionelle Modifikation der Selenocystein-tRNA herangezogen werden. Selenocystein ist funktioneller Bestandteil von Selenoproteinen, welche häufig in den Abbau von oxidativem Stress involviert sind.

Der Mevalonatpfad wird hauptsächlich durch die HMG-CoA-Reduktase (HMGCR) reguliert. Pharmaka vom „Statin“-Typ gelten als wirkungsvolle kompetitive Inhibitoren dieses Enzyms und finden ihren Einsatz bei Patienten zur Behandlung von Hypercholesterolämie, welche eine Grundlage für vaskuläre Krankheiten bildet. Trotz der allgemein guten Verträglichkeit der Statine treten jedoch auch unerwünschte Nebeneffekte, wie Erhöhung der Leberenzyme oder Myopathien auf, deren biochemischer Hintergrund bislang noch im Dunkeln liegt.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente belegen, dass Atorvastatin, Cerivastatin und Lovastatin in klinisch relevanten Dosen die Synthese bestimmter Selenoproteine, wie der Glutathionperoxidase (GPx), in klonalen humanen Hepatocyten post-transkriptionell unterdrücken, wodurch die Zellen anfälliger für oxidativen Stress in Form von Peroxiden werden. Dieser Mechanismus könnte eine Erklärung für die häufig beobachteten abnormen Leberwerte von Statin-behandelten Patienten darstellen.

Endogenes Cholesterol gilt ebenfalls als potenter Inhibitor der HMGCR. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass Cholesterol in verschiedenen Formen, als Low-Density-Lipoprotein (LDL), als 25-Hydroxycholesterol, und als Methylcyclodextrin-Komplex in unterschiedlichen humanen Zelltypen die Selenoproteinsynthese ebenfalls unterdrücken. Der negative Zusammenhang zwischen Cholesterol und bestimmten Selenoproteinen konnte auch in vivo beobachtet werden. In juvenilen Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein Knockout des LDL-Rezeptors sowie auch ein Knockout von Apolipoprotein E zu einer Senkung des Lebercholesterols führte, was in einer Zunahme der GPx in der Leber resultierte.

Die vorliegenden Daten belegen erstmals einen direkten und funktionellen Zusammenhang zwischen dem Mevalonatpfad und der Selenoproteinsynthese. Unterdrückung dieses Pfades, entweder durch exogene Substanzen wie Statine, oder durch endogene Substanzen wie Cholesterol, hat offenbar zur Folge, dass essentielle Zwischenprodukte für die Modifizierung der Selenocystein-tRNA fehlen, was in einer post-transkriptionellen Verminderung der induzierbaren Selenoproteine resultiert. Dies könnte die biochemische Grundlage für einen

Teil der vielfältigen gesundheitlich negativen Auswirkungen schon geringfügig erhöhter Cholesterolspiegel sein.

7 Abstract

The aim of this work was to test the hypothesis that the mevalonic pathway was capable to influence selenoprotein synthesis. Besides cholesterol, the mevalonic pathway synthesizes many other products like isoprenoids, which can be used, for instance, for the post-transcriptional modification of selenocysteine-tRNA. Selenocysteine is an essential part of selenoproteins, which are often involved in reducing oxidative stress in the cell.

The mevalonic pathway is mainly regulated through HMG-CoA-reductase (HMGCR). Statin drugs are well-known competitive inhibitors of this enzyme and are used to treat hypercholesterolemia in patients, which is thought to causally contribute to vascular diseases. Statins are generally well-tolerated, but there are untoward side-effects like the elevation of liver enzymes or myopathy. The biochemical background of these side-effects is still unknown.

In this work it is shown that in clonal human hepatocytes, atorvastatin, cerivastatin and lovastatin at clinically relevant concentrations inhibit the synthesis of certain selenoproteins, like glutathione peroxidase (GPx), on a post-transcriptional level, which makes the cells more susceptible to oxidative stress caused by peroxides. This observation might provide a molecular rationale for the aforementioned statin side-effects.

The endogenous compound cholesterol is also known to be a potent inhibitor of HMGCR, primarily acting as a negative regulator of HMGCR gene transcription. The results of this work show that cholesterol in different forms of application, i.e. as low-density-lipoprotein (LDL), 25-hydroxycholesterol, or methyl cyclodextrin complex, also inhibit selenoprotein synthesis in different human cell types. Investigating in vivo models of altered cholesterol metabolism, it was found that the knockout of the LDL receptor or of apolipoprotein E in juvenile mice was associated with a declined liver cholesterol concentration combined with an increased expression of GPx.

Taken together, these data indicate for the first time a direct functional link between the mevalonic pathway and selenoprotein synthesis. Inhibition of this pathway, either by exogenous statins or by endogenous cholesterol, may lead to a reduction of modified selenocysteine-tRNA, causing a decrease in inducible selenoproteins by a post-transcriptional mechanism. These data may provide a rationale for the multitude of adverse health effects of elevated cholesterol levels, whose origin has remained largely enigmatic to date.

8 Literaturverzeichnis

Adams CM, 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. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 52772-52780.

Akesson B, Bellew T, Burk RF. 1994. Purification of selenoprotein P from human plasma. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1204**: 243-249.

Allmang C, Krol A. 2006. Selenoprotein synthesis: UGA does not end the story. *Biochimie* **88**: 1561-1571.

Amarenco P, Labreuche J. 2009. Lipid management in the prevention of stroke: review and updated meta-analysis of statins for stroke prevention. *Lancet Neurology* **8**: 453-463.

Arnér ES, Holmgren A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry / FEBS* **267**: 6102-6109.

Arnér ESJ. 2009. Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1790**: 495-526.

Atanasova S, von Ahsen N, Schlumbohm C, Wieland E, Oellerich M, Armstrong V. 2006. Marmoset glutathione peroxidases: cDNA sequences, molecular evolution, and gene expression. *Journal of Medical Primatology* **35**: 155-164.

Bastiaanse EM, Höld KM, Van der Laarse A. 1997. The effect of membrane cholesterol content on ion transport processes in plasma membranes. *Cardiovascular Research* **33**: 272-283.

Bays H. 2006. Statin safety: an overview and assessment of the data--2005. *The American Journal of Cardiology* **97**: 6C-26C.

Behne D, Hilmert H, Scheid S, Gessner H, Elger W. 1988. Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **966**: 12-21.

Bellinger FP, He Q, Bellinger MT, Lin Y, Raman AV, White LR, Berry MJ. 2008. Association of selenoprotein p with Alzheimer's pathology in human cortex. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* **15**: 465-472.

Bellinger FP, Raman AV, Reeves MA, Berry MJ. 2009. Regulation and function of selenoproteins in human disease. *The Biochemical Journal* **422**: 11-22.

Bermano G, Nicol F, Dyer JA, Sunde RA, Beckett GJ, Arthur JR, Hesketh JE. 1995. Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *The Biochemical Journal* **311 (Pt 2)**: 425-430.

Björk GR, Ericson JU, Gustafsson CE, Hagervall TG, Jönsson YH, Wikström PM. 1987. Transfer RNA modification. *Annual Review of Biochemistry* **56**: 263-287.

- Björkhem I. 2002.** Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *The Journal of Clinical Investigation* **110**: 725-730.
- Björnstedt M, Hamberg M, Kumar S, Xue J, Holmgren A. 1995.** Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. *The Journal of Biological Chemistry* **270**: 11761-11764.
- Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L, Smieja M, Cambien F, Meyer J, Lackner KJ. 2003.** Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine* **349**: 1605-1613.
- Bleys J, Navas-Acien A, Stranges S, Menke A, Miller ER, Guallar E. 2008.** Serum selenium and serum lipids in US adults. *The American Journal of Clinical Nutrition* **88**: 416-423.
- Bogsrud M, Retterstol K, Ose L, Malt U, Woldseth B. 2009.** The effect of Q10 and selenium supplement on adverse effects in statin treatment. *Abstracts of the XV International Symposium on Atherosclerosis, Boston, USA*.
- Brigelius-Flohé R. 1999.** Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology & Medicine* **27**: 951-965.
- Brown KM, Arthur JR. 2001.** Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutrition* **4**: 593-599.
- Brown MS, Dana SE, Goldstein JL. 1973.** Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts by lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**: 2162-2166.
- Brown MS, Dana SE, Goldstein JL. 1975.** Cholesterol ester formation in cultured human fibroblasts. Stimulation by oxygenated sterols. *The Journal of Biological Chemistry* **250**: 4025-4027.
- Brown MS, Goldstein JL. 1975.** Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts. *Cell* **6**: 307-316.
- Brown MS, Goldstein JL. 1979.** Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 3330-3337.
- Bruckert E, Hayem G, Dejager S, Yau C, Bégaud B. 2005.** Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients--the PRIMO study. *Cardiovascular Drugs and Therapy / Sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* **19**: 403-414.
- Burk RF, Brown DG, Seely RJ, Scaief CC. 1972.** Influence of dietary and injected selenium on whole-body retention, route of excretion, and tissue retention of $^{75}\text{SeO}_3^{2-}$ in the rat. *The Journal of Nutrition* **102**: 1049-1055.

- Burk RF, Hill KE. 1993.** Regulation of selenoproteins. *Annual Review of Nutrition* **13**: 65-81.
- Burk RF, Hill KE. 1994.** Selenoprotein P. A selenium-rich extracellular glycoprotein. *The Journal of Nutrition* **124**: 1891-1897.
- Burk RF, Hill KE. 2005.** Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annual Review of Nutrition* **25**: 215-235.
- Burk RF, Hill KE. 2009.** Selenoprotein P-expression, functions, and roles in mammals. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1790**: 1441-1447.
- Burk RF, Hill KE, Olson GE, Weeber EJ, Motley AK, Winfrey VP, Austin LM. 2007.** Deletion of apolipoprotein E receptor-2 in mice lowers brain selenium and causes severe neurological dysfunction and death when a low-selenium diet is fed. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **27**: 6207-6211.
- Campia I, Lussiana C, Pescarmona G, Ghigo D, Bosia A, Riganti C. 2009.** Geranylgeraniol prevents the cytotoxic effects of mevastatin in THP-1 cells, without decreasing the beneficial effects on cholesterol synthesis. *British Journal of Pharmacology* **158**: 1777-1786.
- Cardoso BR, Ong TP, Jacob-Filho W, Jaluul O, Freitas MID, Cozzolino SMF. 2010.** Nutritional status of selenium in Alzheimer's disease patients. *The British Journal of Nutrition* **103**: 803-806.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 8011-8017.
- Carlson BA, Xu X, Gladyshev VN, Hatfield DL. 2005.** Selective rescue of selenoprotein expression in mice lacking a highly specialized methyl group in selenocysteine tRNA. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 5542-5548.
- Carlson BA, Xu X, Kryukov GV, Rao M, Berry MJ, Gladyshev VN, Hatfield DL. 2004.** Identification and characterization of phosphoseryl-tRNA[Ser]Sec kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 12848-12853.
- Carlson BA, Yoo M, Tsuji PA, Gladyshev VN, Hatfield DL. 2009.** Mouse models targeting selenocysteine tRNA expression for elucidating the role of selenoproteins in health and development. *Molecules (Basel, Switzerland)* **14**: 3509-3527.
- Christensen MJ, Burgener KW. 1992.** Dietary selenium stabilizes glutathione peroxidase mRNA in rat liver. *The Journal of Nutrition* **122**: 1620-1626.
- Colles SM, Irwin KC, Chisolm GM. 1996.** Roles of multiple oxidized LDL lipids in cellular injury: dominance of 7 beta-hydroperoxycholesterol. *Journal of Lipid Research* **37**: 2018-2028.
- Colpo A. 2005.** LDL Cholesterol: "Bad" Cholesterol or Bad Science? *Journal of American*

Physicians and Surgeons **10**: 83-89.

Conrad M. 2009. Transgenic mouse models for the vital selenoenzymes cytosolic thioredoxin reductase, mitochondrial thioredoxin reductase and glutathione peroxidase 4. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1790**: 1575-1585.

Conrad M, Jakupoglu C, Moreno SG, Lippl S, Banjac A, Schneider M, Beck H, Hatzopoulos AK, Just U, Sinowatz F, Schmahl W, Chien KR, Wurst W, Bornkamm GW, Brielmeier M. 2004. Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 9414-9423.

Corsini A, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F. 1999. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacology & Therapeutics* **84**: 413-428.

Dabkowski ER, Williamson CL, Hollander JM. 2008. Mitochondria-specific transgenic overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx4) attenuates ischemia/reperfusion-associated cardiac dysfunction. *Free Radical Biology & Medicine* **45**: 855-865.

Daniels TF, Killinger KM, Michal JJ, Wright RW, Jiang Z. 2009. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *International Journal of Biological Sciences* **5**: 474-488.

Dhingra S, Bansal MP. 2006a. Modulation of hypercholesterolemia-induced alterations in apolipoprotein B and HMG-CoA reductase expression by selenium supplementation. *Chemico-Biological Interactions* **161**: 49-56.

Dhingra S, Bansal MP. 2006b. Hypercholesterolemia and LDL receptor mRNA expression: modulation by selenium supplementation. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* **19**: 493-501.

Diamond AM, Choi IS, Crain PF, Hashizume T, Pomerantz SC, Cruz R, Steer CJ, Hill KE, Burk RF, McCloskey JA. 1993. Dietary selenium affects methylation of the wobble nucleoside in the anticodon of selenocysteine tRNA([Ser]Sec). *The Journal of Biological Chemistry* **268**: 14215-14223.

Dietschy JM, Turley SD. 2002. Control of cholesterol turnover in the mouse. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 3801-3804.

Drake EN. 2006. Cancer chemoprevention: selenium as a prooxidant, not an antioxidant. *Medical Hypotheses* **67**: 318-322.

Eisenberg S. 1984. High density lipoprotein metabolism. *Journal of Lipid Research* **25**: 1017-1058.

Endo A, Tsujita Y, Kuroda M, Tanzawa K. 1977. Inhibition of cholesterol synthesis in vitro and in vivo by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *European Journal of Biochemistry / FEBS* **77**: 31-36.

- Endo A, Tsujita Y, Kuroda M, Tanzawa K. 1979.** Effects of ML-236B on cholesterol metabolism in mice and rats: lack of hypocholesterolemic activity in normal animals. *Biochimica Et Biophysica Acta* **575**: 266-276.
- Engelking LJ, Liang G, Hammer RE, Takaishi K, Kuriyama H, Evers BM, Li W, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. 2005.** Schoenheimer effect explained--feedback regulation of cholesterol synthesis in mice mediated by Insig proteins. *The Journal of Clinical Investigation* **115**: 2489-2498.
- Espenshade PJ, Hughes AL. 2007.** Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annual Review of Genetics* **41**: 401-427.
- Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Bickel C, Schnabel R, Genth-Zotz S, Torzewski M, Lackner K, Munzel T, Blankenberg S. 2007.** Glutathione peroxidase-1 activity, atherosclerotic burden, and cardiovascular prognosis. *The American Journal of Cardiology* **99**: 808-812.
- Esposito LA, Kokoszka JE, Waymire KG, Cottrell B, MacGregor GR, Wallace DC. 2000.** Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. *Free Radical Biology & Medicine* **28**: 754-766.
- Fedacko J, Pella D, Rybar R, Fedackova P. 2009.** Coenzyme Q10 and selenium in statin-associated myopathy treatment. Results of randomised double-blind clinical study. *Abstracts of the PRevent Congress, Stockholm, Sweden*.
- Foresta C, Flohé L, Garolla A, Roveri A, Ursini F, Maiorino M. 2002.** Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biology of Reproduction* **67**: 967-971.
- 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 Radical Biology & Medicine* **27**: 605-611.
- Furman C, Rundlöf A, Larigauderie G, Jaye M, Bricca G, Copin C, Kandoussi AM, Fruchart J, Arnér ESJ, Rouis M. 2004.** Thioredoxin reductase 1 is upregulated in atherosclerotic plaques: specific induction of the promoter in human macrophages by oxidized low-density lipoproteins. *Free Radical Biology & Medicine* **37**: 71-85.
- Gamerding M, Clement AB, Behl C. 2007.** Cholesterol-like effects of selective cyclooxygenase inhibitors and fibrates on cellular membranes and amyloid-beta production. *Molecular Pharmacology* **72**: 141-151.
- Ganther HE. 1999.** Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* **20**: 1657-1666.
- Gasmi A, Garnier R, Galliot-Guilley M, Gaudillat C, Quartenoud B, Buisine A, Djebbar D. 1997.** Acute selenium poisoning. *Veterinary and Human Toxicology* **39**: 304-308.
- Gil G, Faust JR, Chin DJ, Goldstein JL, Brown MS. 1985.** Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme. *Cell* **41**: 249-258.

- Goldstein JL, Brown MS. 1990.** Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**: 425-430.
- Goldstein JL, Brown MS. 2009.** The LDL receptor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **29**: 431-438.
- Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. 2006.** Protein sensors for membrane sterols. *Cell* **124**: 35-46.
- Griffith OW. 1980.** Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry* **106**: 207-212.
- Gromer S, Eubel JK, Lee BL, Jacob J. 2005.** Human selenoproteins at a glance. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* **62**: 2414-2437.
- Guo Z, Van Remmen H, Yang H, Chen X, Mele J, Vijg J, Epstein CJ, Ho YS, Richardson A. 2001.** Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **21**: 1131-1138.
- Guo Z, Ran Q, Roberts LJ, Zhou L, Richardson A, Sharan C, Wu D, Yang H. 2008.** Suppression of atherogenesis by overexpression of glutathione peroxidase-4 in apolipoprotein E-deficient mice. *Free Radical Biology & Medicine* **44**: 343-352.
- Gwon A, Park J, Park J, Baik S, Jeong H, Hyun D, Park KW, Jo D. 2010.** Selenium attenuates A beta production and A beta-induced neuronal death. *Neuroscience Letters* **469**: 391-395.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 22528-22536.
- de Haan JB, Witting PK, Stefanovic N, Pete J, Daskalakis M, Kola I, Stocker R, Smolich JJ. 2006.** Lack of the antioxidant glutathione peroxidase-1 does not increase atherosclerosis in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *Journal of Lipid Research* **47**: 1157-1167.
- Haas D, Kelley RI, Hoffmann GF. 2001.** Inherited disorders of cholesterol biosynthesis. *Neuropediatrics* **32**: 113-122.
- Haas D, Hoffmann GF. 2007.** Mevalonate kinase deficiency and autoinflammatory disorders. *The New England Journal of Medicine* **356**: 2671-2673.
- Hägg D, Englund MCO, Jernås M, Schmidt C, Wiklund O, Hultén LM, Ohlsson BG, Carlsson LMS, Carlsson B, Svensson P. 2006.** Oxidized LDL induces a coordinated up-regulation of the glutathione and thioredoxin systems in human macrophages. *Atherosclerosis* **185**: 282-289.
- Halliwell B. 2007.** Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* **35**:

1147-1150.

Hara S, Shoji Y, Sakurai A, Yuasa K, Himeno S, Imura N. 2001. Effects of selenium deficiency on expression of selenoproteins in bovine arterial endothelial cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **24**: 754-759.

Hatfield D, Lee BJ, Hampton L, Diamond AM. 1991. Selenium induces changes in the selenocysteine tRNA[Ser]Sec population in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* **19**: 939-943.

Hatfield DL, Gladyshev VN. 2002. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Molecular and Cellular Biology* **22**: 3565-3576.

Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. 1955. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *The Journal of Clinical Investigation* **34**: 1345-1353.

Hennekam RCM. 2005. Congenital brain anomalies in distal cholesterol biosynthesis defects. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **28**: 385-392.

Hessler JR, Morel DW, Lewis LJ, Chisolm GM. 1983. Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)* **3**: 215-222.

Hill KE, Chittum HS, Lyons PR, Boeglin ME, Burk RF. 1996. Effect of selenium on selenoprotein P expression in cultured liver cells. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1313**: 29-34.

Holmgren A. 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *The Journal of Biological Chemistry* **264**: 13963-13966.

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of Clinical Investigation* **109**: 1125-1131.

Houten SM, Frenkel J, Waterham HR. 2003. Isoprenoid biosynthesis in hereditary periodic fever syndromes and inflammation. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* **60**: 1118-1134.

Houten SM, Schneiders MS, Wanders RJA, Waterham HR. 2003. Regulation of isoprenoid/cholesterol biosynthesis in cells from mevalonate kinase-deficient patients. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 5736-5743.

Hu G, Antikainen R, Jousilahti P, Kivipelto M, Tuomilehto J. 2008. Total cholesterol and the risk of Parkinson disease. *Neurology* **70**: 1972-1979.

Huang K, Liu H, Chen Z, Xu H. 2002. Role of selenium in cytoprotection against cholesterol oxide-induced vascular damage in rats. *Atherosclerosis* **162**: 137-144.

Imai H, Nakagawa Y. 2003. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical Biology & Medicine* **34**: 145-169.

- Imai H, Saito M, Kirai N, Hasegawa J, Konishi K, Hattori H, Nishimura M, Naito S, Nakagawa Y. 2006.** Identification of the positive regulatory and distinct core regions of promoters, and transcriptional regulation in three types of mouse phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Journal of Biochemistry* **140**: 573-590.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 4431-4435.
- Jaiswal AK, McBride OW, Adesnik M, Nebert DW. 1988.** Human dioxin-inducible cytosolic NAD(P)H:menadione oxidoreductase. cDNA sequence and localization of gene to chromosome 16. *The Journal of Biological Chemistry* **263**: 13572-13578.
- Jameson RR, Carlson BA, Butz M, Esser K, Hatfield DL, Diamond AM. 2002.** Selenium influences the turnover of selenocysteine tRNA([Ser]Sec) in Chinese hamster ovary cells. *The Journal of Nutrition* **132**: 1830-1835.
- 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, the ENHANCE Investigators. 2008.** Simvastatin with or without Ezetimibe in Familial Hypercholesterolemia. *N Engl J Med* **358**: 1431-1443.
- Kim DH, Iijima H, Goto K, Sakai J, Ishii H, Kim HJ, Suzuki H, Kondo H, Saeki S, Yamamoto T. 1996.** Human apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. *The Journal of Biological Chemistry* **271**: 8373-8380.
- Kim LK, Matsufuji T, Matsufuji S, Carlson BA, Kim SS, Hatfield DL, Lee BJ. 2000.** Methylation of the ribosyl moiety at position 34 of selenocysteine tRNA[Ser]Sec is governed by both primary and tertiary structure. *RNA (New York, N.Y.)* **6**: 1306-1315.
- Knowles BB, Howe CC, Aden DP. 1980.** Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science (New York, N.Y.)* **209**: 497-499.
- Kramer GF, Ames BN. 1988.** Isolation and characterization of a selenium metabolism mutant of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* **170**: 736-743.
- Krol A. 2002.** Evolutionarily different RNA motifs and RNA-protein complexes to achieve selenoprotein synthesis. *Biochimie* **84**: 765-774.
- 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 (Baltimore, Md.)* **24**: 241-247.
- Kumaraswamy E, Carlson BA, Morgan F, Miyoshi K, Robinson GW, Su D, Wang S, Southon E, Tessarollo L, Lee BJ, Gladyshev VN, Hennighausen L, Hatfield DL. 2003.** Selective removal of the selenocysteine tRNA [Ser]Sec gene (Trsp) in mouse mammary epithelium. *Molecular and Cellular Biology* **23**: 1477-1488.

- Laaksonen R, Katajamaa M, Päivä H, Sysi-Aho M, Saarinen L, Junni P, Lütjohann D, Smet J, Van Coster R, Seppänen-Laakso T, Lehtimäki T, Soini J, Oresic M. 2006.** A systems biology strategy reveals biological pathways and plasma biomarker candidates for potentially toxic statin-induced changes in muscle. *PloS One* **1**: e97.
- Lambert A, Lescure A, Gautheret D. 2002.** A survey of metazoan selenocysteine insertion sequences. *Biochimie* **84**: 953-959.
- Lange Y, Ye J, Strebel F. 1995.** Movement of 25-hydroxycholesterol from the plasma membrane to the rough endoplasmic reticulum in cultured hepatoma cells. *Journal of Lipid Research* **36**: 1092-1097.
- Lankin VZ, Tikhaze AK, Kukharchuk VV, Konovalova GG, Pisarenko OI, Kaminnyi AI, Shumaev KB, Belenkov YN. 2003.** Antioxidants decreases the intensification of low density lipoprotein in vivo peroxidation during therapy with statins. *Molecular and Cellular Biochemistry* **249**: 129-140.
- LaRosa JC, He J, Vupputuri S. 1999.** Effect of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **282**: 2340-2346.
- Lee S, Shin HS, Shireman PK, Vasilaki A, Van Remmen H, Csete ME. 2006.** Glutathione-peroxidase-1 null muscle progenitor cells are globally defective. *Free Radical Biology & Medicine* **41**: 1174-1184.
- Lei XG, Cheng W, McClung JP. 2007.** Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. *Annual Review of Nutrition* **27**: 41-61.
- Levine GN, Keaney JF, Vita JA. 1995.** Cholesterol reduction in cardiovascular disease. Clinical benefits and possible mechanisms. *The New England Journal of Medicine* **332**: 512-521.
- Li GS, Wang F, Kang D, Li C. 1985.** Keshan disease: an endemic cardiomyopathy in China. *Human Pathology* **16**: 602-609.
- Luc G, Fruchart JC. 1991.** Oxidation of lipoproteins and atherosclerosis. *The American Journal of Clinical Nutrition* **53**: 206S-209S.
- Ma S, Hill KE, Caprioli RM, Burk RF. 2002.** Mass spectrometric characterization of full-length rat selenoprotein P and three isoforms shortened at the C terminus. Evidence that three UGA codons in the mRNA open reading frame have alternative functions of specifying selenocysteine insertion or translation termination. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 12749-12754.
- Maiorino M, Mauri P, Roveri A, Benazzi L, Toppo S, Bosello V, Ursini F. 2005.** Primary structure of the nuclear forms of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in rat spermatozoa. *FEBS Letters* **579**: 667-670.
- Maiorino M, Scapin M, Ursini F, Biasolo M, Bosello V, Flohé L. 2003.** Distinct promoters determine alternative transcription of gpx-4 into phospholipid-hydroperoxide glutathione

peroxidase variants. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 34286-34290.

Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. 2008. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *The FEBS Journal* **275**: 3959-3970.

Mascitelli L, Pezzetta F, Goldstein MR. 2009. Are statin effects mediated through, or in spite of, their cholesterol-lowering action? *Angiology* **60**: 262-263.

Matsui M, Oshima M, Oshima H, Takaku K, Maruyama T, Yodoi J, Taketo MM. 1996. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Developmental Biology* **178**: 179-185.

Maxfield FR, Tabas I. 2005. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* **438**: 612-621.

Meir KS, Leitersdorf E. 2004. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **24**: 1006-1014.

Miranda-Vizuete A, Spyrou G. 2002. Genomic organization and identification of a novel alternative splicing variant of mouse mitochondrial thioredoxin reductase (TrxR2) gene. *Molecules and Cells* **13**: 488-492.

Moghadasian MH, Nguyen LB, Shefer S, Salen G, Batta AK, Frohlich JJ. 2001. Hepatic cholesterol and bile acid synthesis, low-density lipoprotein receptor function, and plasma and fecal sterol levels in mice: effects of apolipoprotein E deficiency and probucol or phytosterol treatment. *Metabolism: Clinical and Experimental* **50**: 708-714.

Moosmann B, Behl C. 1999. The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 8867-8872.

Moosmann B, Skutella T, Beyer K, Behl C. 2001. Protective activity of aromatic amines and imines against oxidative nerve cell death. *Biological Chemistry* **382**: 1601-1612.

Moosmann B, Behl C. 2004a. Selenoprotein synthesis and side-effects of statins. *Lancet* **363**: 892-894.

Moosmann B, Behl C. 2004b. Selenoproteins, cholesterol-lowering drugs, and the consequences: revisiting of the mevalonate pathway. *Trends in Cardiovascular Medicine* **14**: 273-281.

Moreno SG, Laux G, Brielmeier M, Bornkamm GW, Conrad M. 2003. Testis-specific expression of the nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biological Chemistry* **384**: 635-643.

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. *Molecular and Cellular Biology* **18**: 2932-2939.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to

proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**: 55-63.

van der Most PJ, Dolga AM, Nijholt IM, Luiten PGM, Eisel ULM. 2009. Statins: mechanisms of neuroprotection. *Progress in Neurobiology* **88**: 64-75.

Motsenbocker MA, Tappel AL. 1982. A selenocysteine-containing selenium-transport protein in rat plasma. *Biochimica Et Biophysica Acta* **719**: 147-153.

Moustafa ME, Carlson BA, El-Saadani MA, Kryukov GV, Sun QA, Harney JW, Hill KE, Combs GF, Feigenbaum L, Mansur DB, Burk RF, Berry MJ, Diamond AM, Lee BJ, Gladyshev VN, Hatfield DL. 2001. Selective inhibition of selenocysteine tRNA maturation and selenoprotein synthesis in transgenic mice expressing isopentenyladenosine-deficient selenocysteine tRNA. *Molecular and Cellular Biology* **21**: 3840-3852.

Moustafa ME, El-Saadani MA, Kandeel KM, Mansur DB, Lee BJ, Hatfield DL, Diamond AM. 1998. Overproduction of selenocysteine tRNA in Chinese hamster ovary cells following transfection of the mouse tRNA[Ser]Sec gene. *RNA (New York, N.Y.)* **4**: 1436-1443.

Mulder M. 2009. Sterols in the central nervous system. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **12**: 152-158.

Müller C. 1938. Xanthomata, hypercholesterolemia, angina pectoris. *Journal of Internal Medicine Suppl.* **89**: 75-84.

Müller C. 1939. Angina pectoris in hereditary xanthomatosis. *Archives of Internal Medicine* **64**: 675-700.

Mustacich D, Powis G. 2000. Thioredoxin reductase. *The Biochemical Journal* **346 Pt 1**: 1-8.

Nissen SE, Tardif J, Nicholls SJ, Revkin JH, Shear CL, Duggan WT, Ruzyllo W, Bachinsky WB, Lasala GP, Lasala GP, Tuzcu EM. 2007. Effect of torcetrapib on the progression of coronary atherosclerosis. *The New England Journal of Medicine* **356**: 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. Effect of ACAT inhibition on the progression of coronary atherosclerosis. *The New England Journal of Medicine* **354**: 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. *The New England Journal of Medicine* **352**: 29-38.

Novoselov SV, Calvisi DF, Labunskyy 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**: 8003-8011.

- Ohashi K, Osuga J, Tozawa R, Kitamine T, Yagyu H, Sekiya M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Yahagi N, Iizuka Y, Harada K, Gotoda T, Shimano H, Yamada N, Ishibashi S. 2003.** Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 42936-42941.
- Ohvo H, Olsio C, Slotte JP. 1997.** Effects of sphingomyelin and phosphatidylcholine degradation on cyclodextrin-mediated cholesterol efflux in cultured fibroblasts. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1349**: 131-141.
- Olson GE, Winfrey VP, Nagdas SK, Hill KE, Burk RF. 2007.** Apolipoprotein E receptor-2 (ApoER2) mediates selenium uptake from selenoprotein P by the mouse testis. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 12290-12297.
- Palinski W, Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D, Witztum JL. 1989.** Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 1372-1376.
- Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. 2007.** From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxidants & Redox Signaling* **9**: 775-806.
- Pella D, Fedacko J, Rybar R, Fedackova P, Potocekova D. 2008.** Coenzyme Q10 and selenium in statin side effects. Results of randomised double-blind clinical study. *Abstracts of the International Medical CoQ10 Congress, Prague, Czech Republic*.
- Plump AS, Breslow JL. 1995.** Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. *Annual Review of Nutrition* **15**: 495-518.
- Prietsch V, Mayatepek E, Krastel H, Haas D, Zundel D, Waterham HR, Wanders RJA, Gibson KM, Hoffmann GF. 2003.** Mevalonate kinase deficiency: enlarging the clinical and biochemical spectrum. *Pediatrics* **111**: 258-261.
- Ravnskov U. 2002.** A hypothesis out-of-date. the diet-heart idea. *Journal of Clinical Epidemiology* **55**: 1057-1063.
- Rayman MP. 2000.** The importance of selenium to human health. *Lancet* **356**: 233-241.
- Reid PC, Urano Y, Kodama T, Hamakubo T. 2007.** Alzheimer's disease: cholesterol, membrane rafts, isoprenoids and statins. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **11**: 383-392.
- Rung E, Friberg PA, Bergh C, Billig H. 2006.** Depletion of substrates for protein prenylation increases apoptosis in human periovulatory granulosa cells. *Molecular Reproduction and Development* **73**: 1277-1283.
- Rushworth SA, Chen X, Mackman N, Ogborne RM, O'Connell MA. 2005.** Lipopolysaccharide-induced heme oxygenase-1 expression in human monocytic cells is mediated via Nrf2 and protein kinase C. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **175**: 4408-4415.

- Saito Y, Takahashi K. 2002.** Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein. *European Journal of Biochemistry / FEBS* **269**: 5746-5751.
- Saito Y, Yoshida Y, Akazawa T, Takahashi K, Niki E. 2003.** Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 39428-39434.
- Sathasivam S, Lecky B. 2008.** Statin induced myopathy. *BMJ (Clinical Research Ed.)* **337**: a2286.
- Savaskan NE, Ufer C, Kühn H, Borchert A. 2007.** Molecular biology of glutathione peroxidase 4: from genomic structure to developmental expression and neural function. *Biological Chemistry* **388**: 1007-1017.
- Schnabel R, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Torzewski M, Lubos E, Bickel C, Cambien F, Tired L, Münzel T, Blankenberg S. 2005.** Glutathione peroxidase-1 and homocysteine for cardiovascular risk prediction: results from the AtheroGene study. *Journal of the American College of Cardiology* **45**: 1631-1637.
- Schneider M, Förster H, Boersma A, Seiler A, Wehnes H, Sinowatz F, Neumüller C, Deutsch MJ, Walch A, Hrabé de Angelis M, Wurst W, Ursini F, Roveri A, Maleszewski M, Maiorino M, Conrad M. 2009.** Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **23**: 3233-3242.
- Schoenheimer R, Breusch F.** Synthesis and destruction of cholesterol in the organism. *Journal of Biological Chemistry* **103**: 439-448.
- Schomburg L, Schweizer U, Holtmann B, Flohé L, Sendtner M, Köhrle J. 2003.** Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *The Biochemical Journal* **370**: 397-402.
- Schroepfer GJ. 2000.** Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiological Reviews* **80**: 361-554.
- Schweizer U, Bräuer AU, Köhrle J, Nitsch R, Savaskan NE. 2004.** Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Research. Brain Research Reviews* **45**: 164-178.
- Sengupta A, Carlson BA, Hoffmann VJ, Gladyshev VN, Hatfield DL. 2008.** Loss of housekeeping selenoprotein expression in mouse liver modulates lipoprotein metabolism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **365**: 446-452.
- Shrimali RK, Weaver JA, Miller GF, Starost MF, Carlson BA, Novoselov SV, Kumaraswamy E, Gladyshev VN, Hatfield DL. 2007.** Selenoprotein expression is essential in endothelial cell development and cardiac muscle function. *Neuromuscular Disorders: NMD* **17**: 135-142.
- Simons K, Ikonen E. 2000.** How cells handle cholesterol. *Science (New York, N.Y.)* **290**: 1721-1726.
- Sodha NR, Boodhwani M, Ramlawi B, Clements RT, Mieno S, Feng J, Xu S, Bianchi C,**

- Sellke FW. 2008.** Atorvastatin increases myocardial indices of oxidative stress in a porcine model of hypercholesterolemia and chronic ischemia. *Journal of Cardiac Surgery* **23**: 312-320.
- Stark H. 2003.** Medizinisch-chemische Aspekte von Statinen. *Pharmazie in unserer Zeit* **32**: 464-470.
- Steinberg D. 2006.** Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: the discovery of the statins and the end of the controversy. *Journal of Lipid Research* **47**: 1339-1351.
- Steinbrenner H, Alili L, Bilgic E, Sies H, Brenneisen P. 2006.** Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage. *Free Radical Biology & Medicine* **40**: 1513-1523.
- Steinbrenner H, Sies H. 2009.** Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1790**: 1478-1485.
- Stüve O, Youssef S, Dunn S, Slavin AJ, Steinman L, Zamvil SS. 2003.** The potential therapeutic role of statins in central nervous system autoimmune disorders. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* **60**: 2483-2491.
- Sun QA, Zappacosta F, Factor VM, Wirth PJ, Hatfield DL, Gladyshev VN. 2001.** Heterogeneity within animal thioredoxin reductases. Evidence for alternative first exon splicing. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 3106-3114.
- Suzuki T, Kelly VP, Motohashi H, Nakajima O, Takahashi S, Nishimura S, Yamamoto M. 2008.** Deletion of the selenocysteine tRNA gene in macrophages and liver results in compensatory gene induction of cytoprotective enzymes by Nrf2. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: 2021-2030.
- Swanson CA, Longnecker MP, Veillon C, Howe M, Levander OA, Taylor PR, McAdam PA, Brown CC, Stampfer MJ, Willett WC. 1990.** Selenium intake, age, gender, and smoking in relation to indices of selenium status of adults residing in a seleniferous area. *The American Journal of Clinical Nutrition* **52**: 858-862.
- Takahashi K, Takeya M, Sakashita N. 2002.** Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Medical Electron Microscopy: Official Journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan* **35**: 179-203.
- Tham DM, Whitin JC, Kim KK, Zhu SX, Cohen HJ. 1998.** Expression of extracellular glutathione peroxidase in human and mouse gastrointestinal tract. *The American Journal of Physiology* **275**: G1463-1471.
- Thannhauser SJ, Magendantz H. 1938.** The different clinical groups of xanthomatous diseases: a clinical physiological study of 22 cases. *Annals of Internal Medicine* **11**: 1662-1746.
- Thomas JP, Maiorino M, Ursini F, Girotti AW. 1990.** Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ

reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *The Journal of Biological Chemistry* **265**: 454-461.

Tobert JA. 2003. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nature Reviews. Drug Discovery* **2**: 517-526.

Traulsen H, Steinbrenner H, Buchczyk DP, Klotz L, Sies H. 2004. Selenoprotein P protects low-density lipoprotein against oxidation. *Free Radical Research* **38**: 123-128.

Tsujimoto A, Takemura G, Mikami A, Aoyama T, Ohno T, Maruyama R, Nakagawa M, Minatoguchi S, Fujiwara H. 2006. A therapeutic dose of the lipophilic statin pitavastatin enhances oxidant-induced apoptosis in human vascular smooth muscle cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **48**: 160-165.

Valentine WM, Abel TW, Hill KE, Austin LM, Burk RF. 2008. Neurodegeneration in mice resulting from loss of functional selenoprotein P or its receptor apolipoprotein E receptor 2. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **67**: 68-77.

Valentine WM, Hill KE, Austin LM, Valentine HL, Goldowitz D, Burk RF. 2005. Brainstem axonal degeneration in mice with deletion of selenoprotein p. *Toxicologic Pathology* **33**: 570-576.

Vaughan CJ, Gotto AM. 2004. Update on statins: 2003. *Circulation* **110**: 886-892.

Veres Z, Kim IY, Scholz TD, Stadtman TC. 1994. Selenophosphate synthetase. Enzyme properties and catalytic reaction. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 10597-10603.

Wang C, Liu P, Liao JK. 2008. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends in Molecular Medicine* **14**: 37-44.

Warner GJ, Berry MJ, Moustafa ME, Carlson BA, Hatfield DL, Faust JR. 2000. Inhibition of selenoprotein synthesis by selenocysteine tRNA[Ser]^{Sec} lacking isopentenyladenosine. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 28110-28119.

Werkö L. 2008. End of the road for the diet-heart theory? *Scandinavian Cardiovascular Journal: SCJ* **42**: 250-255.

Westerink WMA, Schoonen WGEJ. 2007. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* **21**: 1581-1591.

Whitmer RA, Sidney S, Selby J, Johnston SC, Yaffe K. 2005. Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. *Neurology* **64**: 277-281.

Williams K, Frayne J, Hall L. 1998. Expression of extracellular glutathione peroxidase type 5 (GPX5) in the rat male reproductive tract. *Molecular Human Reproduction* **4**: 841-848.

Wingler K, Böcher M, Flohé L, Kollmus H, Brigelius-Flohé R. 1999. mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins. *European Journal of Biochemistry / FEBS* **259**: 149-157.

Wiviott SD, Cannon CP. 2006. Update on lipid-lowering therapy and LDL-cholesterol targets. *Nature Clinical Practice. Cardiovascular Medicine* **3**: 424-436.

Wolozin B. 2004. Cholesterol, statins and dementia. *Current Opinion in Lipidology* **15**: 667-672.

Xu X, Carlson BA, Mix H, Zhang Y, Saira K, Glass RS, Berry MJ, Gladyshev VN, Hatfield DL. 2007. Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. *PLoS Biology* **5**: e4.

Yoo M, Tsuji PA, Gladyshev VN, Hatfield DL. 2009. Mouse models targeting selenocysteine tRNA expression for elucidating the role of selenoproteins in health and development. *Molecules (Basel, Switzerland)* **14**: 3509-3527.

Young PA, Kaiser II. 1975. Aminoacylation of Escherichia coli cysteine tRNA by selenocysteine. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **171**: 483-489.

Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. 1992. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science (New York, N.Y.)* **258**: 468-471.

Zhang Y, Zhou Y, Schweizer U, Savaskan NE, Hua D, Kipnis J, Hatfield DL, Gladyshev VN. 2008. Comparative analysis of selenocysteine machinery and selenoproteome gene expression in mouse brain identifies neurons as key functional sites of selenium in mammals. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: 2427-2438.

Zhong W, Wang C, Chang T, Lee W. 2003. Lovastatin induces apoptosis of anaplastic thyroid cancer cells via inhibition of protein geranylgeranylation and de novo protein synthesis. *Endocrinology* **144**: 3852-3859.

9 Lebenslauf

10 Eigene Publikationen

11 Abkürzungsverzeichnis

25-HC	25-Hydroxycholesterol
A37	Adenin 37
A β	Amyloid- β -Peptid
Abb.	Abbildung
ACAT	Acetyl-CoA-Cholesterol-Acyltransferase
ADHP	10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin
ApoA /B /E	Apolipoprotein A /B /E
ApoER2	Apolipoprotein E Rezeptor-2
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ARE	<i>Antioxidant Response Element</i>
BCA	Bicinchoninsäure
Bq	Becquerel
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CETP	Cholesterylester Transfer Protein
COPII	<i>coat protein II</i>
CoQ	Coenzym Q
CuSO ₄	Kupfersulfat
Cys	Cystein
d	<i>day(s)</i> , Tag(e)
DCFA	2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DIO	Iodothyronin Deiodinase
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagles's medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Dithio(bis-2-nitrobenzoesäure)
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFsec	Translations-Elenongationsfaktor
FAD(H ₂)	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FH	familiäre Hypercholesterolämie
g	Erdbeschleunigung, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
g	Gramm
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion (reduziert)
GSH-R	Glutathionreduktase
GSSG	Glutathion (oxidiert)
h	<i>hour(s)</i> , Stunde(n)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HDL	<i>high density lipoprotein</i> , Lipoprotein hoher Dichte
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HMG	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HMGCR	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase

HO1	Hämoxygenase 1 (HO1)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
i ⁶ A	Isopentenyladenosin
IPP	Isopentenylpyrophosphat
kb	Kilobasen (1000 Basenpaare)
KBr	Kaliumbromid
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumphosphat
LCAT	Lecithin:Cholesterol-Acyltransferase
LDL	<i>low density lipoprotein</i> , Lipoprotein geringer Dichte
LDL-R	LDL-Rezeptor
M	Molar
MCD	Methyl-β-Cyclodextrin
mcm ⁵ U(m)	5-Methylcarboxymethyluridin-(2'-O-methylribose)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
Met	Methionin
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
MK	Mevalonat-Kinase
ml	Milliliter
mM	Millimolar
μg	Mikrogramm
μM	Mikromolar
MOD5	tRNA-Isopentenyltransferase (Hefe)
MPA	Metaphosphorsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Na ₂ HPO ₄	Natriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-(phosphat)
NaOH	Natronlauge
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NMD	<i>nonsense mediated decay</i>
NQO	NAD(P)H-Chinon Oxidoreduktase 1
Nrf2	<i>Nuclear Factor-like 2</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate bufferd saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PLTP	Phospholipid-Transferprotein
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	<i>reverse transcription</i> , reverse Transkription
s	Sekunde
s.	siehe
S1P / S2P	<i>Site-1 protease / Site-2 protease</i>
SBP	<i>SECIS-binding protein</i>
SCAP	<i>SREBP-cleavage-activating-protein</i>

SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
Se	Selen
Se ²⁻	Selenid
Sec	Selenocystein
SECIS	<i>selenocysteine insertion sequence</i>
SecS	Selenocystein-Synthase
Sec-tRNA	Selenocystein-tRNA
SelP	Selenoprotein P
SeO ₃ ²⁻	Selenit
Ser	Serin
SPS	Selenophosphat-Synthetase
SR-B1-R	Scavenger-Rezeptor B1
SRE	<i>sterol-regulatory-element</i>
SREBP	<i>sterol-regulatory-element-binding-protein</i>
TBS	<i>Tris bufferd saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
tBuOOH	tert-Butylhydroperoxid
TEA	Triethanolamin
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNB	2-Nitro-5-thiobenzoessäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
tRNA ^{[Ser]Sec}	Selenocystein-tRNA
Trx	Thioredoxin
TRxR	Thioredoxinreduktase
U	<i>unit(s)</i> , Einheit(en)
U34	Uracil 34
UGA	Uracil – Guanin – Adenin
V	Volt
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i> , Lipoprotein sehr geringer Dichte
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

12 Danksagung