

Neue menschliche Selenoproteine: Selenoprotein P und Thioredoxin-Reduktase

New Human Selenoproteins: Selenoprotein P and Thioredoxin Reductase

N. Schütze¹, Ingeborg Dreher¹, F. Jakob¹ und J. Köhrle^{1,2}

Zusammenfassung: Selen ist ein essentielles Spurenelement. In den letzten Jahren sind 14 selenocysteinhaltige sogenannte Selenoproteine identifiziert und teilweise funktionell charakterisiert worden, die in endokrinen Organen, im Zentralnervensystem und anderen Geweben exprimiert werden. Obwohl ihre Funktion und Bedeutung erst teilweise entschlüsselt werden konnte, spielen sie offenbar eine bedeutende Rolle in Entwicklung, Wachstum und Differenzierung. Zu diesen neuen Selenoproteinen gehören Selenoprotein P und die Thioredoxin-Reduktase. Selenoprotein P ist ein stark glykosyliertes Plasmaprotein noch unbekannter Funktion, das hauptsächlich von der Leber sezerniert wird und bis zu 70% des Plasmaselens enthält. Die Thioredoxin-Reduktase repräsentiert ein NADPH-abhängiges Flavoprotein mit zentraler Bedeutung für den Redoxhaushalt der Zelle. Vermittelt durch das Substrat Thioredoxin ist die Thioredoxin-Reduktase an der Proteinfaltung und der Modulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren beteiligt. Somit beeinflusst die Thioredoxin-Reduktase Zell-Wachstum, -Differenzierung und -Protektion und könnte an Prozessen der Tumorentstehung beteiligt sein. Nachweisverfahren für die Selenoproteine Selenoprotein P und Thioredoxin-Reduktase könnten für die Aufklärung eines Zusammenhangs zwischen Selenstatus und biologischer Funktion hilfreich sein.

Schlüsselwörter: Selen/Stoffwechsel; Selenocystein; Selenoproteine; Thioredoxin-Reduktase; Transkriptionsfaktoren.

Summary: Selenium is an essential trace element. In the recent years, 14 proteins containing selenocysteine have been identified and partially characterised from endocrine organs, the CNS as well as other tissues. Although their function and relevance only has been elucidated in part, they obviously play an important role in development, growth and differentiation. Se-

lenoprotein P and thioredoxin reductase belong to these new selenoproteins. Selenoprotein P is a highly glycosylated plasma protein with unknown function which is mainly synthesised in liver and contains up to 70% of total plasma selenium. Thioredoxin reductase represents a NADPH dependent flavoprotein which plays a central role for the redox balance of cells. Together with the substrate thioredoxin it is involved in protein folding and modulation of activity of transcription factors. Thereby, TRR affects alterations of cell growth, differentiation, and protection and could take part in processes relevant to tumor formation. Assay systems for the detection of the selenoproteins selenoprotein P and thioredoxin reductase could be helpful for the elucidation of links between the selenium status and biological function.

Keywords: Selenium/metabolism; Selenocysteine; Selenoproteins; Thioredoxin Reductase; Transcription Factors.

Zur Gruppe der Selenoproteine gehören Selenbindende Proteine, die Selen als lösliche Komponente aufweisen, sowie Proteine, die kovalent gebundenes Selen in Form der Aminosäuren Selenomethionin oder Selenocystein enthalten. Während Selenomethionin abhängig vom nutritiven Selenangebot nur zufällig, anstelle von Methionin, ins Protein eingebaut wird, folgt die Selenocystein-Insertion einem einzigartigen Mechanismus, der für Prokaryonten vollständig aufgeklärt wurde, für Eukaryonten zum Teil noch unbekannt ist [Übersichtsartikel 1-3]: Kennzeichnend für den Einbau von Selenocystein ins Protein liegt in der mRNA ein UGA-Codon im Leserahmen vor, das normalerweise ein Opal-Stop-Codon darstellt. In Verbindung mit einer Sekundärstruktur im 3'-Bereich der mRNA, dem sogenannten SECIS-Element („selenocysteine insertion sequence“), kommt es jedoch zur Insertion von Selenocystein und nicht zum Kettenabbruch. Dazu wird eine spezielle tRNA^{Sec}, das Produkt des selC-Gens, zunächst mit Serin beladen. Die Selenocystein-Synthase (SelA) modifiziert Serin anschließend zum Selenocystein. Als Selen-Donor wird Selenophosphat benötigt, das durch die ATP-abhängige Aktivierung von Selenid durch die Selenophosphat-Synthetase (SelD) synthetisiert wird. Ein spezieller

¹Klinische Forschergruppe, Medizinische Poliklinik, Universität Würzburg

²Korrespondenzadresse: Prof. Dr. J. Köhrle, Klinische Forschergruppe der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg, Röntgenring 11, D-97070 Würzburg. Fax: +49-931-56537
Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt (Projekt von F. Jakob und J. Köhrle; Wi 231/9-2).
Eingegangen: 30. Juli 1998

Tabelle 1 Eukaryontische Selenocystein-haltige Proteine

Selenoprotein	Funktion, Bildungsort	Referenz
<i>Glutathion Peroxidasen</i>		
cGPx	H ₂ O ₂ -Degradation, ubiquitär	[8, 9]
pGPx	H ₂ O ₂ -Degradation, Niere	[10, 11]
Gl-GPx	H ₂ O ₂ -Degradation, Gastrointestinaltrakt	[12]
PHGPx	Phospholipid-, und Cholesterol-, Hydroperoxid-Abbau	[13, 14]
<i>Deiodase-Isoenzyme</i>		
Typ I 5'-Deiodase	T ₄ + ESe ⁻ → T ₃ +ESeI	[15-17]
Typ II 5'-Deiodase	T ₄ + ESe ⁻ → T ₃ +ESeI ?	[18]
Typ III 5-Deiodase	T ₄ + ESe ⁻ → rT ₃ + ESe ⁻ + I ⁻ ?	[19-20]
Selenoproteine P		
SeP 10	Leber und andere Gewebe	[23]
SeP 12	Gehirn	[24]
TRR	Reduktion von Thioredoxin und anderen Substraten	[21, 22]
SPS2	Selenophosphat-Synthese	[7]
<i>Selenoproteine unbekannter Funktion</i>		
Selenoprotein W	Muskel	[25]
Selenoprotein p15	Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Prostata-Zellen	[26]
Selenoprotein	Hoden, Spermatozoen	[27]
Selenoprotein PES	Prostata	[28]
Selenoprotein	verschiedene Gewebe	[29]

Elongationsfaktor (SelB) beliefert dann das translizierende Ribosom mit der Selenocysteyl-tRNA^{Sec}. Eukaryontische Homologe zu SelB und SelA wurden noch nicht identifiziert. Dagegen ist das selC-Gen im Tierreich ubiquitär verbreitet [4]. Entsprechende Knockout-Mäuse zeigten Lethalität bereits im frühen Embryonalstadium, wogegen Heterozygote keinen Phänotyp aufwiesen [5]. Nach der Identifizierung der humanen Selenophosphat-Synthetase (SelD) [6], wurde kürzlich eine zweite Isoform (SPS2) beschrieben, die selbst ein Selenoprotein ist. Die Existenz eines Selenocysteinrests im aktiven Zentrum von SPS2 erlaubt damit eine Selen-abhängige Autoregulation der Selenoproteinsynthese [7].

Neben SPS2 wurden in den vergangenen Jahren eine Reihe eukaryontischer Selenoproteine identifiziert, die in Tabelle 1 aufgeführt sind. In Proteinen bekannter Funktion liegt Selenocystein jeweils im aktiven Zentrum vor und ist maßgeblich an der Katalyse von Redox-Reaktionen beteiligt. Die Gruppe der Selenoproteine mit bekannter enzymatischer Aktivität umfaßt neben SPS2 die Glutathionperoxidasen, die Deiodasen, sowie die Thioredoxin-Reduktase.

Die Glutathionperoxidasen sind eine Familie Selenocysteyl-haltiger Enzyme, die mit reduziertem Glutathion als Kofaktor Peroxide abbauen und damit die Zelle vor reaktiven Sauerstoffintermediaten schützen. Bisher wurden vier genetisch verschiedene Mitglieder identifiziert, die sich hinsichtlich ihrer Gewe-

beverteilung, Wirkort und Substratspezifität unterscheiden [8-14].

Eine weitere Selenoenzymfamilie sind die Deiodase-Isozyme, die eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung und Inaktivierung von Schilddrüsenhormonen spielen. Die beiden 5'-Deiodase-Isoenzyme Typ I und Typ II, die die Deiodierung von L-Thyroxin (T₄) zum thyromimetisch aktiven 3,5,3'-Triiod-L-Thyronin (T₃), sowie die 5-Deiodase, die die Inaktivierung von T₃ und T₄ katalysiert, lassen sich ebenfalls durch ihre Substratpräferenz, Gewebeverteilung und Regulation unterscheiden [15-20].

Die Funktion des Flavoproteins Thioredoxin-Reduktase als zentraler Redox-Regulator war bereits lange Zeit bekannt. Erst vor kurzem wurde jedoch entdeckt, daß die Thioredoxin-Reduktase ebenfalls ein Selenoprotein ist, und daß der enthaltene Selenocysteinrest essentiell für die enzymatische Aktivität des Proteins ist [21, 22]. Ebenfalls ein neu-kloniertes Selenoprotein ist das Plasmaprotein Selenoprotein P, das bis zu zehn, eine Isoform im Rind sogar zwölf Selenocysteyl-Reste enthalten kann und dessen Funktion nach wie vor unklar ist [23, 24]. Darüber hinaus wurden in verschiedenen Geweben weitere Selenoproteine beschrieben, deren physiologische Bedeutung ebenfalls unbekannt ist [25-29].

Selenoprotein P

Bis zu 70% des Plasmaselens von Mensch und Ratte sind in Selenoprotein P (SeP), einem stark glykosylierten, Histidin- und Cystein-reichen Plasmaprotein

Nicht standardisierte Abkürzungen: FCS, fetales Kälberserum; SeP, Selenoprotein P; T₃, 3,5,3'-Triiod-L-Thyronin; T₄, L-Thyroxin; TRR, Thioredoxin-Reduktase; Trx, Thioredoxin.

enthalten [30]. Das 57 kDa-Protein wurde ursprünglich aus Rattenplasma, nachfolgend auch aus humanem Plasma isoliert [31,32] und wird hauptsächlich von der Leber sezerniert [23]. Ein breites Verteilungsmuster im Northern Blot läßt jedoch auch in den meisten anderen Geweben die Expression von SeP vermuten [33]. In der SeP-mRNA von Mensch und Ratte finden sich zehn UGA-Codons, die zusammen mit zwei SECIS-Elementen im 3'-untranslatierten Bereich für den Einbau von zehn Selenocysteinresten codieren. Bei Isolierung des Proteins aus Rattenplasma konnten jedoch nur 7-8 Selenatome pro SeP-Molekül gefunden werden [34-36]. Diese Diskrepanz konnte bisher noch nicht zweifelsfrei geklärt werden. Möglicherweise werden einige der UGA-Codons, die für Selenocystein codieren, während der Translation als Stop-Codons interpretiert, so daß ein Abbruch der entstehenden Proteinkette erfolgt. Entsprechendes wurde in der Ratte für das zweite der zehn UGA-Codons bereits beschrieben, wodurch die Existenz multipler Isoformen im Rattenplasma, die sich auch hinsichtlich des Glykosylierungsgrades unterschieden, erklärt wurde [37]. Neben dem SeP-Gen der Ratte und dem humanen Gen, das kürzlich auf Chromosom 5q31 lokalisiert wurde [38], wurden eng verwandte Gene von SeP auch in Nagern und im Rind gefunden [39, 24]. Im bovinen Gehirn wurde zusätzlich zum „klassischen“ SeP auch das Gen für ein Selenoprotein mit zwölf Selenocysteinresten kloniert und charakterisiert [24].

Außer einer verminderten Synthese von SeP unter Selenmangel gab es lange Zeit keinen Hinweis auf die biologische Regulation der SeP-Genexpression. Die Klonierung des humanen Selenoprotein P-Promotors erlaubte die funktionelle Analyse der SeP-Expression auf molekularer Ebene. Konstruktion von SeP-Promotor-Luciferase-Reportergenkonstrukten und deren transiente Transfektion in HepG2-Leber- und CaCo2-Colonkarzinomzellen ergab eine Hemmung der SeP-Promotoraktivität durch Behandlung der Zellen mit den proinflammatorischen Cytokinen Interleukin-1 β , Interferon γ und Tumor Nekrose Faktor α [40]. Damit einhergehend nahm in HepG2-Zellen im Northern Blot die SeP-Transkriptmenge, sowie, analysiert durch Markierung der Zellen mit ^{75}Se , auch die Proteinmenge nach Cytokinbehandlung ab (unsere unveröffentlichten Daten). Offensichtlich wird unter Akut-Phase-Reaktion, hier simuliert durch die Cytokinbehandlung, die SeP-Expression negativ reguliert. Die verringerte Expression und Sekretion von SeP unter Akut-Phase-Bedingungen könnte eine mögliche Erklärung für die beobachteten niedrigen Serum-Selenspiegel bei einer Reihe von akuten und chronischen Erkrankungen bieten [41, 42]. In gesunden Individuen ergab sich mit der Verfügbarkeit eines Radioimmunoassays für humanes SeP eine hohe Korrelation der SeP-Konzentration zum Serum-Selenspiegel [43, 44], wodurch SeP als diagnostisch relevanter Indikator für den Selenstatus eines Individuums dienen kann.

Die biologische Funktion von SeP ist trotz verschiedener Hinweise noch weitgehend ungeklärt. Ursprüng-

lich wurde wegen des hohen Selengehalts eine Selen-transport- oder Speicherfunktion angenommen [45]. Dagegen spricht jedoch, daß SeP in der Hierarchie der Selenoproteine eine gehobene Stellung einnimmt, d. h. unter Selenmangel gegenüber anderen Selenoproteinen bevorzugt mit Selen versorgt wird. Zudem macht die im Northern Blot beobachtete breite Gewebeverteilung eine Funktion als Selentransportprotein unwahrscheinlich [46, 47, 33]. Am wahrscheinlichsten ist wohl eine antioxidative Schutzfunktion, da in SeP neben 10 Selenocysteinresten 17 Cysteinreste vorliegen, die das Protein für den Einsatz in Redox-Reaktionen prädestinieren. *Burk et al.* konnten zeigen, daß beim Vergleich zwischen SeP und anderen Selenocystein-haltigen zellulären Schutzenzymen die Prävention vor Diquat induzierter Lebernekrose in Selen-defizienten Ratten nach Selen-Repletion am besten mit der SeP-Konzentration korrelierte [48]. Dieser Befund ist kompatibel mit der Tatsache, daß Diquat die Plasmamembran der Hepatocyten oxidativ schädigt und eine Bindung von SeP an Plasmamembranen beobachtet wurde [49]. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß in der entsprechenden Untersuchung noch nicht charakterisierte Selenverbindungen für die beobachteten Seleneffekte verantwortlich sind oder die Änderung der SeP-Expression lediglich einen Indikator für das Maß der beobachteten Leberschädigung darstellt. Immunhistochemische Untersuchungen ergaben eine Bindung von SeP an Endothelzellen, die von den Autoren als Schutzfunktion von SeP am Endothel interpretiert wurde [50]. Allerdings zeigt SeP generell Heparinbindungseigenschaft, wodurch eine Bindung ans Endothel nicht weiter überrascht. Des weiteren wurde die Bindung von Hg-Se-Komplexen an SeP beschrieben, weshalb eine Rolle von SeP in der Schwermetall-Detoxifikation diskutiert wurde [51].

Obwohl die Funktion von SeP also noch nicht abschließend geklärt werden konnte, bietet die Analyse der SeP-Konzentration im Serum aufgrund des hohen Selengehaltes des Proteins einen guten integrativen Parameter der Selenversorgung eines Individuums. Allerdings zeigten Antikörper-basierende Verfahren, daß die Analytik von SeP aufgrund seiner Glykoproteinatur und der Existenz trunkierter Formen nicht ganz unproblematisch ist [52].

Das menschliche Selenoprotein Thioredoxin-Reduktase

Die Thioredoxin-Reduktase (TRR) aus *E. coli*, Hefe, Ratte, Affe und Mensch ist intensiv auf Proteinebene untersucht worden [53]. Danach gehört die TRR zur Gruppe der NADPH-abhängigen Disulfid-Oxidoreduktasen und repräsentiert ein FAD-haltiges Flavoprotein, welches das Substrat Thioredoxin aber *in vitro* auch andere Substrate wie Vitamine und Pharmaka reduziert. Kürzlich wurde die humane TRR durch die Arbeitsgruppe *Gasdaska et al.* (1995) aus Lungen-Adenokarzinomzellen kloniert [54]. In der Folge

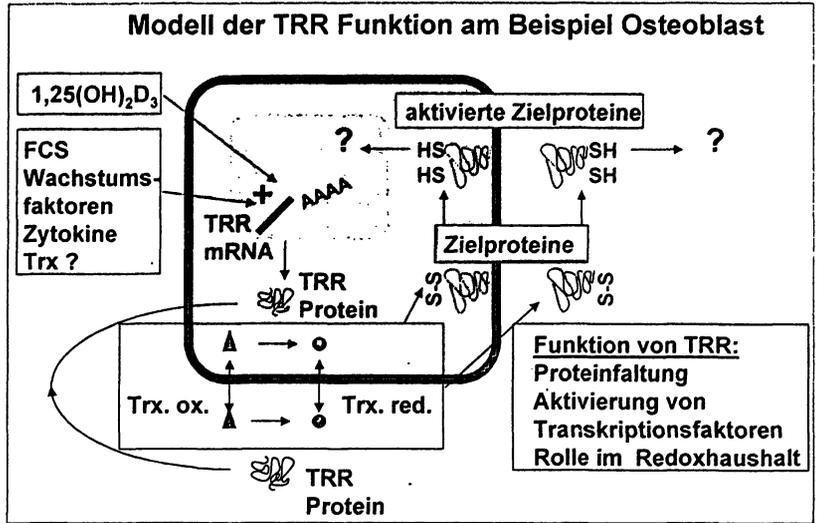


Abbildung 1 Modell der TRR-Funktion am Beispiel Osteoblast: Die mRNA-Menge der Thioredoxin-Reduktase (TRR) wird durch Vitamin D (1,25(OH)₂-D₃), Serum (FCS), Wachstumsfaktoren und Zytokine verändert. Dadurch kommt es zu Veränderungen im TRR-Proteingehalt. Aufgabe des Proteins ist die Reduktion von oxidiertem Thioredoxin (Trx). Dieses Substrat ist dann in der Lage, exponierte Disulfidbrücken in Zielproteinen zu spalten und somit freie SH-Gruppen zu generieren, die oftmals wichtige Bedeutung für Struktur und/oder Funktion des Proteins haben. Letztendlich wird durch TRR die Proteinfaltung und die Aktivität von Transkriptionsfaktoren moduliert.

wurde die humane TRR durch Inkorporation von ⁷⁵Selen sowie durch Proteinanalyse als ein Selenoprotein mit Selenocystein nahe dem C-Terminus identifiziert [21, 22, 55]. Die Inkorporation des Selenocysteins in die humane TRR scheint dem bekannten Mechanismus bei Eukaryonten zu folgen [56]. Es gibt Hinweise darauf, daß die Anwesenheit dieses Selenocysteins für die TRR-Enzymaktivität Voraussetzung ist. Eine neue humane Oxidoreduktase, KDRF, [57] stellte sich als identisch zur TRR heraus [56].

Das TRR/Thioredoxin (Trx) System spielt eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung [58] sowie der Modulation des Redoxhaushaltes der Zelle [59, 60] und ist an der Aktivierung der ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 beteiligt [61, 62]. Möglicherweise sind auch weitere Transkriptionsfaktoren Zielproteine der menschlichen TRR wie z. B. p53, dessen Aktivität in *Saccharomyces cerevisiae* über Reduktion aktiver Disulfide moduliert wird [63]. Die Wirkung des TRR/Trx Systems auf die Genexpression via Redox-abhängiger Faktoren repräsentiert also einen generellen Mechanismus, der bisher jedoch nur unvollständig aufgeklärt ist. Thioredoxin selbst wird auch als „adult T-cell leukemia-derived factor“ eine Rolle als potenter Wachstumsfaktor zugeschrieben [64].

Die Regulation der TRR-Expression ist bislang nur ungenügend verstanden. Die TRR mRNA-Gehalte werden auf der Ebene der Neusynthese nicht durch Selen reguliert; jedoch wurde eine Erhöhung der Halbwertszeit der TRR mRNA durch allerdings hohe Selen-Konzentrationen in HT29 Colon-Karzinom Zellen gefunden [65]. Experimente in Zelllinien ergaben variable Stimulationen der TRR-Enzymaktivität zwischen 2- und 60fach im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1 μ mol/l Selenit [65-68]. Dies legt einen Zusammenhang zwischen Selenstatus und funktioneller TRR-Enzymaktivität im Organismus nahe. Generell wird aus

Tumorzelllinien bzw. aus Tumorgewebe verglichen mit Normalgewebe eine höhere TRR-Expression berichtet [58, 65]. Gleichfalls wird oftmals eine Überexpression des Trx bei Karzinomen beobachtet ([69]. Offenbar hat das TRR/Trx System eine Bedeutung für Zellwachstum, -Differenzierung, -Protektion und könnte an Prozessen der Tumorentstehung beteiligt sein. Dieser Zusammenhang wird auch durch den Nachweis von Autoimmunantikörpern bei einem Patienten mit Ovarialkarzinom unterstrichen [70]. Somit könnte eine Dysregulation der TRR-Expression über die Trx-abhängige Redox-modulierende Genexpression mit der Tumorentstehung verknüpft sein. Aus diesem Grund stellen Inhibitoren der TRR potentielle Wirksubstanzen in der Therapie solider Tumoren dar [71, 72].

Möglicherweise kann die TRR auch sezerniert werden, zumal aus Zellkulturmedium im Western-Blot ein spezifisches Signal mit einem TRR-Antiserum dokumentiert wurde [57] und aus Zellkulturüberstand TRR-Enzymaktivität nachweisbar ist (unsere unpublizierten Ergebnisse). Allerdings bleibt die Regulation der Sekretion der TRR zu klären, da spezifische Signalsequenzen zur Sekretion nicht bekannt sind.

Wir haben die TRR als 1,25(OH)₂-D₃ responsives Gen in humanen Osteoblasten mit Hilfe von Differential Display PCR (ddPCR) identifiziert und kloniert [67]. Die TRR mRNA-Menge und Aktivität wurde durch FCS erhöht. Die Aktivität des Selenoproteins TRR war in hFOB-Zellen [67] wie auch in anderen Zelltypen [65, 66] vom Selenstatus abhängig. Zudem wurde die TRR-Enzymaktivität durch 1,25(OH)₂-D₃ nur unter Bedingungen der Selen-Supplementation (Supplementation des Zellkulturmediums mit 100 nmol/l Natriumselenit) nicht aber unter Selen-defizienten Bedingungen (Zellkulturmedium mit 10% FCS) erhöht. Diese neuen Befunde weisen auf einen Zusammenhang zwischen adäquater Versorgung mit dem Spurenelement Selen und der Wirkung von 1,25(OH)₂-

D₃ auf differenzierte Osteoblasten hin. Die Regulation der TRR durch 1,25(OH)₂-D₃ konnte von uns auch in einem zweiten 1,25(OH)₂-D₃-responsiven Zellkultur-system (Monozyten) nachgewiesen werden. Sowohl in menschlichen peripheren Blut-Monozyten als auch in der Zelllinie THP-1 war die TRR-mRNA-Menge als auch die TRR-Enzymaktivität durch die 1,25(OH)₂-D₃-Behandlung erhöht [68].

Zur Zeit kann noch nicht abgeschätzt werden, wann sensitive Nachweisverfahren zur Bestimmung der TRR aus Körperflüssigkeiten zur Verfügung stehen. Da es Hinweise auf die Existenz von alternativen TRR-Formen gibt, könnte die Etablierung dieser Assays möglicherweise noch erschwert werden. Zusammenfassend stellt das TRR/Trx-System ein ubiquitäres Enzymsystem mit zentraler Bedeutung für den Redoxhaushalt der Zelle dar. Selen, aber auch andere Faktoren können via TRR direkt oder über Trx die Aktivität wichtiger Transkriptionsfaktoren modulieren und somit die Transkription regulieren.

Literatur

- Böck A, Forchhammer K, Heider J, Baron C. Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. *Trends Biochem Sci* 1991; 16: 463-7.
- Low SC, Berry MJ. Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 1996; 21: 203-7.
- Lee BJ, Park SI, Park JM, Chittum HS, Hatfield DL. Molecular biology of selenium and its role in human health. *Mol Cells* 1996; 6: 509-20.
- Lee BJ, Rajagopalan M, Kim YS, You KH, Jacobson KB, Hatfield DL. Selenocysteine tRNA^{Se} gene is ubiquitous within the animal kingdom. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 1940-9.
- Bösl MR, Takaku K, Oshima M, Nishimura S, Taketo MM. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp). *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5531-4.
- Low SC, Harney JW, Berry MJ. Cloning and functional characterization of human-selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. *J Biol Chem* 1995; 270: 21659-64.
- Guimaraes M J, Peterson D, Vicari A, Cocks BG, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Ferrick DA, Kastalein RA, Bazan JF, Zlotnik A. Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 15086-91.
- Flohé L, Günzler W, Schock HH. Glutathione peroxidase, a selenoenzyme. *FEBS Letters* 1973; 32: 132-4.
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973; 179: 588-90.
- Avissar N, Within JC, Allen PZ, Wagner DD, Liegey P, Cohen HJ. Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1989; 264: 15850-5.
- Avissar N, Ornt DB, Yagil Y, Horowitz S, Watkins RH, Kerl EA, Takahashi K, Palmer IS, Cohen HJ. Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am J Physiol* 1994; 266: C367-75.
- Chu F-F, Doroshow JH, Esworthy RS. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* 1992; 267: 2571-6.
- Roveri A, Casasco A, Maiorino M, Dalan P, Calligaro A, Ursini F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification. *J Biol Chem* 1992; 267: 6142-6.
- Brigelius Flohé R, Aumann KD, Blocker H, Gross G, Kiess M, Klöppel KD, Maiorino M, Roveri A, Schuckelt R, Ursini F, Winkler E, Flohé L. Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence. *J Biol Chem* 1994; 269: 7342-8.
- Behne D, Kyriakopoulos A, Meinhold H, Köhrle J. Identification of type I 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173: 1143-9.
- Berry MJ, Banu L, Larsen PR. Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature* 1991; 349: 438-40.
- Arthur JF, Nicol F, Beckett GJ. Hepatic iodothyronine 5'-deiodinase. The role of selenium. *Biochem J* 1990; 272: 537-40.
- Davey JC, Becker KB, Schneider MJ, St.Germain GL, Galton VA. Cloning of a cDNA for the type II iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* 1995; 270: 26786-9.
- Croteau W, Whittemore SK, Schneider MJ, St.Germain DL. Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* 1995; 270: 16569-75.
- Salvatore D, Low S, Berry M, Maia AL, Harney JW, Croteau W, St.Germain DL, Larsen PR. Type 3 iodothyronine deiodinase: cloning, in vitro expression, and functional analysis of the placental selenoenzyme. *J Clin Invest* 1995; 96: 2421-30.
- Tamura T, Gladyshev VN, Liu S-Y, Stadtman TC. The mutual sparing effects of selenium and vitamin E in animal nutrition may be further explained by the discovery that mammalian thioredoxin reductase is a selenoenzyme. *Biofactors* 1995; 5:99-102.
- Tamura T und Stadtman TC. A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells. purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:1006-11.
- Burk R F, Hill K E. Selenoprotein P: A selenium-rich extracellular glycoprotein. *J Nutr* 1994; 124: 1891-7.
- Saijoh K, Saito N, Lee MJ, Fujii M, Kobayashi T, Sumino K. Molecular cloning of cDNA encoding a bovine selenoprotein P-like protein containing 12 selenocysteines and a (His-Pro) rich domain insertion, and its regional expression. *Mol Brain Res* 1995; 30: 301-11.
- Yeh J-Y, Beilstein MA, Andrews JS, Whanger PD. Tissue distribution and influence of selenium status on levels of selenoprotein W. *FASEB J* 1995; 9: 392-6.
- Gladyshev VN, Jeang K-T, Wootton JC, Hatfield DL. A new selenium-containing protein. *J Biol Chem* 1998; 273: 8910-5.
- Behne D, Weiss-Nowak C, Westphal C, Gessner H, Kyriakopoulos A. Studies on the distribution and characteristics of new selenium-containing proteins. *Analyst* 1995; 120: 823-5.
- Kalcklösch M, Kyriakopoulos A, Hammel C, Behne D. A new selenoprotein found in the glandular epithelial cells of the rat prostate. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 217: 162-70.
- Kyriakopoulos A, Weiss-Nowak C, Behne D. Untersuchungen von 20 kDa Selenoproteinen mit gelelektrophoretischen Methoden. In: Radóla, B. J. (ed) *Elektrophoresis Forum '91*. Freising-Weißenstephan, TU München, 1991: 593-98.
- Harrison I, Littlejohn D, Fell GS. Distribution of selenium in human blood plasma and serum. 1996; 121 (2): 189-94.
- Motchnik PA, Tappel AL. Rat plasma selenoprotein P properties and purification. *Biochim Biophys Acta* 1989; 993: 27-35.
- Eberle B, Haas HJ. Purification of selenoprotein Ph from human plasma. *J Trace Elem. Electrolytes Health Dis* 1993; 7: 217-21.
- Dreher I, Schmutzler C, Jakob F, Köhrle J. Expression of selenoproteins in various rat and human tissues and cell lines. *J Trace Elem Med Biol* 1997; 11: 83-91.
- Read R, Bellew T, Yang J-G, Hil, KE, Palmer IS, Burk RF. Selenium and amino acid composition of selenoprotein P, the major selenoprotein in rat serum. *J Biol Chem* 1990; 265 (9): 17899-905.
- Hill, KE, Lloyd RS, Yang J-G, Read R, Burk, RF. The cDNA for rat selenoprotein P contains 10 TGA codons in the open reading frame. *J Biol Chem* 1991; 266: 10050-3.
- Hill KE, Lloyd RS, Burk RF. Conserved nucleotide sequences in the open reading frame and 3' untranslated region of selenoprotein P mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 537-41.
- Himeno, S, Chittum, HS, Burk, R. F. Isoforms of selenoprotein P in rat plasma. *J Biol Chem* 1996; 271: 15769-75.
- Hill KE, Dasouki M, Phillips JA, Burk RF. Human selenoprotein P gene maps to 5q31. *Genomics* 1996; 36: 550-1.
- Steinert P, Ahrens M, Gross G, Flohé L. cDNA and deduced polypeptide sequence of a mouse selenoprotein P. *BioFactors* 1997; 6: 311-9.
- Dreher I, Jakobs TC, Köhrle J. Cloning and characterization of the human Selenoprotein P promoter. *J Biol Chem* 1997; 272 (46): 29364-71.

41. Hawker FH, Stewart PM, Snitch PJ. Effects of acute illness on selenium homeostasis. *Crit Care Med* 1990; 18: 442.
42. Angstwurm M, Schottdorf J, Gärtner R. Influence of selenium-substitution on thyroid function and outcome on patients with severe inflammatory response syndrom (SIRS). Proceedings and voice recording (CD), 6th Thyroid Symposium: Thyroid and trace elements. Graz, Blackwell Wissenschaft, Berlin, Wien 1996: 74-80.
43. Marchaluk E, Persson-Moschos M, Thorling, EB, Akesson B. Variation in selenoprotein P concentration in serum from different european regions. *Europ J Clin Nutr* 1995; 49: 42-8.
44. Persson-Moschos M, Huang W, Srikumar TS, Akesson B. Selenoprotein P in serum as a biochemical marker of selenium status. *Analyst* 1995; 120: 833-36.
45. Molsenbocker MA, Tappel AL. A selenocysteine-containing selenium-transport protein in rat plasma. *Biochim Biophys Acta* 1982; 709: 160-65.
46. Hill KE, Lyons PR, Burk RF. Differential regulation of rat liver selenoprotein mRNAs in selenium deficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;185: 260-63.
47. Gross M, Oertel M, Köhrle J. Differential selenium-dependent expression of type I 5'-deiodinase and glutathione peroxidase in the porcine epithelial kidney cell line LLC-PK1. *Biochem J* 1995; 306: 851-56.
48. Burk RF, Hill KE, Awad JA, Morrow JD, Kato T, Cockell KA, Lyons PR. Pathogenesis of diquat-induced liver necrosis in selenium-deficient rats: assessment of the roles of lipid peroxidation and selenoprotein P. *Hepatology* 1995; 21: 561-69.
49. Wilson DS, Tappel AL. Binding of plasma selenoprotein P to cell membranes. *J Inorg Biochem* 1993; 51: 707-14.
50. Burk RF, Hill KE, Boeglin ME, Ebner FF, Chittum HS. Selenoprotein P associates with endothelial cells in rat tissues. *Histochem Cell Biol* 1997; 108 (1): 11-5.
51. Yoneda S, Suzuki KT. Equimolar Hg-Se complex binds to selenoprotein P. *Biochem Biophys Res Com* 1997; 231: 7-11.
52. Hesse K, Dreher I, Schmutzler C, Meißner-Weigl J, Köhrle J. Eigenschaften von Selenoprotein P aus der humanen Leberkarzinom-Zelllinie HepG2. Posterbeitrag Jahrestagung der Gesellschaft für Mineralstoffe und Spurenelemente e. V., München, Mai 1998
53. Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 1989;264:13963-6.
54. Gasdaska PY, Gasdaska JR, Cochran S, Powis G. Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase. *FEBS Letters* 1995;373:5-9.
55. Gladyshev VN, Jeang KT, Stadtman TC. Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6146-51.
56. Miranda-Vizuette A und Spyrou G. The novel oxidoreductase KDRF (KM-102-derived reductase-like factor) is identical with human thioredoxin reductase. *Biochem J* 1997;325:287-8.
57. Koishi R, Kawashima I, Yoshimura C, Sugawara M, Serizawa N. Cloning and characterisation of a novel oxidoreductase KDRF from a human bone marrow-derived stromal cell-line KM-102. *J Biol Chem* 1997;272:2570-7.
58. Holmgren A, und Björnstedt M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 1995;252:199-208.
59. Luthman M, Holmgren A. Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterisation. *Biochemistry* 1982;21:6628-33.
60. Arscott LD, Gromer S, Schirmer RH, Becker K, Williams Jr. CH. The mechanism of thioredoxin reductase from human placenta is similar to the mechanisms of lipoamide dehydrogenase and glutathione reductase and is distinct from the mechanism of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;94:3621-6.
61. Hirota K, Matsui M, Iwata S, Nishiyama A, Mori K, Yodoi J. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and ref-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3633-8.
62. Kim IY und Stadtman TC. Inhibition of NF-KappaB DNA binding and nitric oxide induction in human T cells and lung adenocarcinoma cells by selenite treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:12904-7.
63. Pearson GD und Merrill GF. Deletion of the saccharomyces cerevisiae TRR1 gene encoding thioredoxin reductase inhibits p53-dependent reporter gene expression. *J Biol Chem* 1998;273: 5431-4.
64. Wakasugi N, Tagaya Y, Wakasugi H, Mitsui A, Maeda M, Yodoi J, Tursz T. Adult T-cell leukemia-derived factor/thioredoxin, produced by both human T-lymphotropic virus type I- and Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes, acts as an autocrine growth factor and synergizes with interleukin 1 and interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:8282-6.
65. Gallegos A, Berggren M, Gasdaska JR, Powis G. Mechanisms of the regulation of thioredoxin reductase activity in cancer cells by the chemopreventive agent selenium. *Cancer Res* 1997;57: 4965-70.
66. Berggren M, Gallegos A, Gasdaska J, Powis G. Cellular thioredoxin reductase activity is regulated by selenium. *Anticancer Res* 1997;17:3377-80.
67. Schütze N, Bachthaler M, Lechner A, Köhrle J, Jakob. Identification by Differential Display PCR of the Selenoprotein Thioredoxin Reductase as a $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D₃ responsive Gene in Human Osteoblasts - Regulation by Selenite. *Biofactors* 1998;7:299-310.
68. Schütze N, Fritsche J, Schneider, D., Ebert R, Kreutz, M., Jakob, F. (1998) Thioredoxin reductase is regulated by $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D₃ and selenite in human monocytes. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 106C Suppl 1. S43 (Abstract)
69. Baker A, Payne CM, Briehl MM und Powis G. Thioredoxin, a gene found overexpressed in human cancer, inhibits apoptosis in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1997;57:5262-7.
70. Muro Y, Ogawa Y, Kato Y, Hagiwara M. Autoantibody to thioredoxin reductase in an ovarian cancer patient. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;242:267-71.
71. Kirkpatrick DL, Ehrmantraut G, Stettner S, Kunkel M, Powis G. Redox active disulfides: the thioredoxin system as a drug target. *Oncol Res* 1997;9:351-6.
72. Powis G, Gasdaska JR, Gasdaska PY, Berggren M, Kirkpatrick DL, Engman L, Cotgreave IA, Angulo M, Baker A. Selenium and the thioredoxin redox system: effects on cell growth and death. *Oncol Res* 1997;9:303-12.