

Technische Universität München

Klinik für Strahlentherapie und radiologische Onkologie
Klinikum rechts der Isar, München
(Leitung: Prof. Dr. St. E. Combs)

In Vitro Versuchsreihe zum Einfluss von Selen als Radikalfänger bei Mammakarzinomzellen *Birgit Susanne Herold*

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des
akademischen Grades des Doktors der Medizin (Dr.med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Th. E. Schmid
2. Prof. Dr. St. E. Combs

Die Dissertation wurde am 10.08.2015 bei der Technischen
Universität München eingereicht und durch die Fakultät der
Medizin am 06.04.2016 angenommen.

Inhalt

1	Einleitung	11
1.1	Geschichtlicher Hintergrund von Selen	11
1.2	Selen und seine chemischen Eigenschaften	12
1.3	Selen als Antioxidans	12
1.4	Selen und Selenstoffwechsel	13
1.4.1	Pharmakokinetik	13
1.4.2	Selenabhängige Proteine	15
1.4.2.1	Glutathion-Peroxidase	15
1.4.2.2	Thioredoxin-Reduktase	17
1.4.2.3	Selenoprotein P	17
1.4.2.4	Deiodasen	18
1.4.3	Pharmakologische Wirkung	19
1.4.4	Empfehlungen zur Selenzufuhr	21
1.5	Selen und Mammakarzinom	25
1.5.1	Inzidenz und Mortalität des Mammakarzinoms	25
1.5.2	Ätiologie des Mammakarzinoms	26
1.5.3	Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms	31
1.5.4	Strahlentherapie im Zusammenhang mit Selen	32
1.5.5	Mammakarzinom im Zusammenhang mit Selen	33
1.6	Zielsetzung der Arbeit	33
2	Material und Methoden	34
2.1	Materialverzeichnis	34
2.2	Zelllinien und Zellkultur	36
2.3	Messung zur Induktion der Apoptose mit Annexin-PI-Färbung	37
2.4	Messung zur Induktion der Apoptose mit FITC-Aktiv-Caspase-3-Färbung	41
2.5	Messung der Anzahl von DNS-Doppelstrangbrüchen	43
2.6	Messung des klonogenen Zellüberlebens	48
2.7	Statistische Auswertung	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Einfluss von Selen und Bestrahlung auf die Apoptosehäufigkeit von Mammakarzinomzellen mittels Annexin-PI-Färbung	50
3.2	Einfluss von Selen und Bestrahlung auf die Apoptosehäufigkeit von Mammakarzinomzellen mittels FITC aktiv Caspase 3 Färbung	52
3.3	Einfluss von Selen und Bestrahlung auf die DNA-Doppelstrangbruchhäufigkeit von Mammakarzinomzellen	54
3.4	Einfluss von Selen und Bestrahlung auf das klonogene Zellüberleben von Mammakarzinomzellen	56
4	Diskussion	59
5	Zusammenfassung	67
6	Danksagung	68
7	Lebenslauf	69

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
BET	Brusterhaltende Therapie
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovines Serumalbumin
BSA	Bovines Serumalbumin
Bzw	Beziehungsweise
Ca	Karzinom
CLIS	Lobuläres Carcinoma in situ
Cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCiS	Duktales Carcinoma in situ
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Et al	Und andere
FACS	Facscalibur
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Oxidierter Form von Glutathion
Gy	Gray
H ₂ O	Wasser

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ Se	Selenwasserstoff
Her2	Human epidermal growth factor receptor 2
Kv	Kilovolt
l	Liter
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
Mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
Nacl	Natriumchlorid
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH/H ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
PE	Plattierungseffizienz
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidium Iodide
PS	Phosphatidylserine
RKI	Robert-Koch-Institut
ROOH	Hydroperoxid
ROS	Reactive oxygen species
Rpm	Rounds per minute
Sek	Sekunde
Sel	Selenoprotein
SF	Überlebensfraktion
SH ₂	Selenwasserstoff
SS	Schwangerschaft
Std	Stunde
T ₃	Triiodthyronin
T ₄	Thyroxin
TNM	Classification of Malignant Tumours
t-RNA	Transfer Ribonukleinsäure

TrxR

Thioredoxin-Reduktase

US

United States

UV

Ultraviolett

WHO

World Health Organization

Z

Zeit

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb.1: Selenverbindungen
- Abb.2: Darstellung des Selenstoffwechsels
- Abb.3: Die Rolle von selenhaltigen Enzymen als Antioxidans-
Glutathionperoxidase
- Abb.4: Die Rolle von selenhaltigen Enzymen als Antioxidans
- Abb.5: Die Rolle von selenhaltigen Enzymen als Antioxidans-
Thioredoxin-Reduktase
- Abb.6,7: Selenhaltige Proteine im Überblick
- Abb.8: Selenmangelgefährdete Gruppen
- Abb.9: Selenzufuhr laut DGE
- Abb.10: Selengehalt in Serum und Vollblut
- Abb.11: Glutathion-Peroxidase-Aktivität im Serum
- Abb.12: Brustkrebsinzidenz in Europa
- Tab.1: TNM-Klassifikation
- Tab.2: Materialliste
- Abb.13: Schema einer Annexin-PI- Messung
- Abb.14: Originaldarstellung einer Annexin-PI-Messung aus eigener
Datenerhebung
- Abb.15: γ -H2AX-Foci in MCF7-Zellkernen nach 24 h Reparaturzeit
ohne Bestrahlung und Selen
- Abb.15b: γ -H2AX-Foci in MCF7-Zellkernen nach 4 Gy Bestrahlung und
24 h Reparaturzeit
- Abb.15c: γ -H2AX-Foci in MCF7-Zellkernen nach Behandlung
mit 140 $\mu\text{g} / \text{l}$ Selen und 24 h Reparaturzeit
- Abb.15d: γ -H2AX-Foci in MCF7-Zellkernen nach Behandlung mit
400 $\mu\text{g} / \text{l}$ Selen und 4 Gy Bestrahlung und 24 h Reparaturzeit
- Abb.15e: γ -H2AX-Foci in MDA-MB 231 Zellkernen nach Behandlung mit
140 $\mu\text{g} / \text{l}$ Selen und 4 Gy Bestrahlung und 24 h Reparaturzeit
- Abb.16a: Durchschnittliche Apoptosehäufigkeit der Zelllinie MCF7
in % [Gated Events %] mittels Annexin-PI-Färbung
- Abb.16b. Durchschnittliche Apoptosehäufigkeit der Zelllinie MDA-MB 231
in % [Gated Events %] mittels Annexin-PI-Färbungn-PI-Färbung

- Abb.16c: Durchschnittliche Apoptosehäufigkeit der Zelllinie T47D in % [Gated Events %] mittels Annexin-PI-Färbung
- Tab.3: Signifikanzniveau der Apoptosehäufigkeit mittels Annexin-PI-Färbung
- Abb.17a: Durchschnittliche Apoptosehäufigkeit der Zelllinie MCF7 in % [Gated Events %] mittels FITC aktiv Caspase 3 Färbung
- Abb.17b: Durchschnittliche Apoptosehäufigkeit der Zelllinie MDA-MB 231 in % [Gated Events %] mittels FITC aktiv Caspase 3 Färbung
- Abb.17c: Durchschnittliche Apoptosehäufigkeit der Zelllinie T47D in % [Gated Events %] mittels FITC aktiv Caspase 3 Färbung
- Tab.4: Signifikanzniveau der Apoptosehäufigkeit mittels FITC aktiv Caspase 3 Färbung
- Abb.18a: Durchschnittliche DNA- Doppelstrangbruchhäufigkeit der Zelllinie MCF7
- Abb.18b: Durchschnittliche DNA- Doppelstrangbruchhäufigkeit der Zelllinie MDA-MB 231
- Tab.5: Signifikanzniveau der DNA- Doppelstrangbruchfähigkeit mittels γ H2AX- Methode
- Abb.19: Strahlensensibilität der Zellreihen MCF7, MDA-MB231 und T47D mit 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy und 8 Gy

Prolog

**Feste Entschlossenheit und Klarheit im Innern,
sanfte Anpassung und Stärke im Äußern;
das ist der Weg, etwas zu erreichen**

[Asiatische Weisheit]

*In Liebe und Dankbarkeit meiner Mutter, René,
meiner Schwester und meinen Großeltern*

1 Einleitung

1.1 Geschichtlicher Hintergrund von Selen

- 1817 Entdeckung des Spurenelements Selen durch den schwedischen Chemiker Jöns Jakob Berzelius.
- 1935 Manuskriptveröffentlichung durch Beath über die Toxizität von Selen und deren Einfluss auf Tiere in den USA, welche durch die Weidung auf selenreichen Böden erkrankten.
- 1943 Feststellung des karzinogenen Effekts von Selen durch Nelson et al. mittels Tierversuchen an Ratten.
- 1957 Etablierung des Spurenelements Selen in der Forschung durch den deutschen Biochemiker Klaus Schwarz, welcher durch Selensubstitution bei Ratten Lebernekrose verhindern konnte.
- 1969 Herstellung des Zusammenhangs von Selen und Glutathionperoxidase durch Rotruck et al.

Außerdem wurde in diesem Jahr auf einen antikarzinogenen Effekt von Selen hingewiesen.

- 1973 Widerlegung der Hypothese von 1943:

Selen wurde eine nicht krebserzeugende Wirkung zugesprochen und es wurde herausgefunden, dass Selen vor Krebserkrankungen schützt.

- Ebenfalls in den 70er Jahren, erfuhr das Spurenelement besondere Aufmerksamkeit im Zusammenhang mit der Erkrankung Keshan und Kaschin-Beck in Teilen Chinas ([Oldfield, 2002](#)).
 - » Die Kaschin-Beck Erkrankung geht mit einer Gelenkdeformation einher, welche auf der Degeneration, Atrophie und Nekrose des Knorpels beruht und das erste Mal 1849 beschrieben wurde. Der Zusammenhang der Kaschin-Beck Erkrankung und Selen wurde in Tierversuchen mit Ratten herausgefunden. Seitdem wird eine Supplementierung in selenarmen Regionen, mit dem Auftreten der Erkrankung, gefördert ([Kolsteren, 1992](#)).
 - » Der erste Fall der Keshan Erkrankung wurde 1935 beschrieben. Die Erkrankung zeichnet sich aus durch eine Durchblutungsstörung, Kardiomyopathie und Herzmuskelnekrose und steht in Zusammenhang mit einem Selenmangelsyndrom ([Liu et al., 2002](#)).

1.2 Selen und seine chemischen Eigenschaften

Selen gehört zu den Halbmetallen und befindet sich in der VI Hauptgruppe des Periodensystems. Es hat die Ordnungszahl 34 und kann in verschiedene Oxidationsstufen übergehen. Selen bekommt durch seinen Einbau in die Aminosäuren Cystein und Methionin eine wichtige Funktion im menschlichen Organismus (Falbe J, 1992).

Selenverbindungen

Oxidationsstufe	Chemische Struktur	Name der Verbindung
-II	H_2Se	Hydroselenid
-II	Se^{2-}	Selenid
0	Se	Selen
+IV	SeO_2 H_2SeO_3	Selendioxid Selenige Säure
+IV	SeO_3^{2-} Na_2SeO_3	Selenit Natriumselenit
+VI	SeO_3 H_2SeO_4 SeO_4^{2-}	Selentrioxid Selensäure Selenat

Abb.1: Selenverbindungen

(modifiziert nach Falbe J, Regitz M, 1992: Römpp-Chemie-Lexikon. Stuttgart, NewYork)

1.3 Selen als Antioxidans

Selen ist ein lebensnotwendiges Spurenelement, mit ausgeprägten antioxidativen Eigenschaften.

In diversen Studien wurde herausgefunden, dass Selen einen positiven Einfluss, sowohl auf das Krebswachstum, als auch auf chronische Erkrankungen ausübt. Hierzu zählen unter anderem Diabetes mellitus, inflammatorische Prozesse und kardiale Erkrankungen (Fairweather-Tait et al., 2011).

Durch schädigende Einflüsse von außen, wie UV- Strahlung, einzelne Chemikalien und ionisierende Strahlung werden zahlreiche Stoffwechselwege in Gang gesetzt. Dadurch entstehen für den Körper schädliche Radikale, sogenannte „reactive oxygen species“ (ROS).

Durch verschiedene Mechanismen, können diese Radikale im Organismus abgefangen werden und dadurch die Zellen vor Schäden geschützt werden. Daran beteiligt sind verschiedene Proteine, welche Selen als wichtigen Bestandteil beinhalten (Yeo et al., 2008).

Die organischen selenhaltigen Aminosäuren Selenomethionin und Selenocystein sind der Grundbaustein dieser Proteine (Wastney et al., 2011).

Selenocystein wird in Tieren und im Menschen gebildet (G.S., 2006). Es wird direkt als aktives Zentrum in den Proteinen verankert. Dazu zählen unter anderem wichtige Enzyme, wie die Glutathionperoxidase, Thioredoxinperoxidase und Selenprotein P (Hatfield and Gladyshev, 2002, Gladyshev and Hatfield, 1999).

Selenomethionin, welches in Hefen und Pflanzen zu finden ist (G.S., 2006), steht dem Einbau in die Proteine nicht direkt zur Verfügung und ist somit nicht produktiv an der Selenverwertung beteiligt. Es muss zunächst in Selenocystein umgebaut werden.

Das anorganische Selenit ist direkt bioverfügbar und steht dem Körper optimal für den Proteineinbau zur Verfügung (Wastney et al., 2011).

Im Falle eines Selenmangelzustandes, kann es zu einem Abbruch der selenhaltigen Proteinsynthese kommen (Reeves and Hoffmann, 2009). Dies bedeutet, dass antioxidative Enzyme, wie die Glutathionperoxidase oder Thioredoxinperoxidase, vermindert oder nicht mehr gebildet werden können und dadurch verstärkt oxidativer Stress entsteht, wodurch die Zellen geschädigt werden.

Dieser Vorgang deutet auf die wichtige antioxidative Wirkung von Selen im Körper hin und zeigt deren wichtigen Zusammenhang in der Krebsentstehung und Bekämpfung.

1.4 Selen und Selenstoffwechsel

1.4.1 Pharmakokinetik

Selen wird über die Enterozyten des Darms aufgenommen und an unterschiedliche Orte im Organismus weitergeleitet. Dazu zählen das Blutplasma, die Nieren, die Leber und das lymphatische System. Von diesen Ausgangspunkten wird Selen zurück in den Darm oder das Plasma geleitet oder als unabhängiger Selenspeicher im Körper belassen. Es kann somit im Gewebe gespeichert oder in Form von Urin oder Faeces ausgeschieden werden (Wastney et al., 2011). Im Plasma findet der Haupttransport mittels Selenprotein P statt (Fairweather-Tait et al., 2011).

In der Pharmakokinetik ist die Unterscheidung zwischen organischem und anorganischem Selen sehr wichtig.

Zentraler Punkt in beiden Stoffwechselwegen ist der Selenwasserstoff (H_2Se). Dieser entsteht in den Erythrozyten des Blutes (G.S., 2006). Betrachtet man nun zuerst den Weg des anorganischen Selenits, so wird dieses direkt in H_2Se überführt und anschließend in Selenid umgebaut. Dieses kann nun weiter als Selenocystein in selenhaltige Proteine, wie z.B. die Glutathionperoxidase, eingebaut werden. Bei diesem Schritt wird Selenocystein an eine t-RNA gebunden und synthetisiert, um anschließend dem Einbau in die entsprechenden Selenoproteine zur Verfügung zu stehen (Papp et al., 2007, Turanov et al., 2011).

Der alternative Weg des anorganischen Selenits geht über einen Abbauprozess. Hierbei wird Methylselenol und Dimethylselenol gebildet, welches via Atmung oder Faeces ausgeschieden wird. Als Trimethylselenol kann es im Urin ausgeschieden werden. Ein Teil des Selens wird über die Leber in den enterohepatischen Kreislauf eingeführt.

Das organische Selen wird entweder direkt als Selenocystein in H_2Se umgebaut und folgt dem oben genannten Stoffwechselweg, oder es wird als Selenomethionin in Selenocystein umgebaut und dann in den Stoffwechselkreislauf eingeführt (Fairweather-Tait et al., 2011).

Bei vermehrter Anreicherung von organischem Selen kann es zu einer Akkumulation im Körper kommen. Anorganisches Selen kann leichter und schneller ausgeschieden werden und ist deshalb für eine Substitution im medizinischen Bereich besser geeignet (G.S., 2006).

Beim anorganischen Selenit wird laut RKI eine Halbwertszeit von 65-115 Tage angegeben, Selenmethionin hingegen unterliegt einer Halbwertszeit von 200-300 Tagen (G.S., 2006).

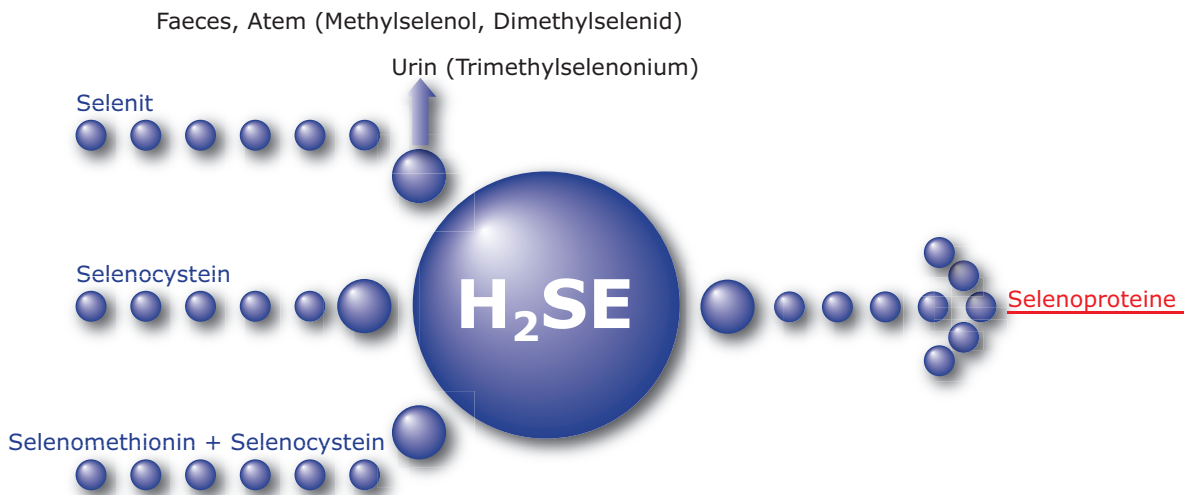


Abb.2: Darstellung des Selenstoffwechsels

1.4.2 Selenabhängige Proteine

1.4.2.1 Glutathion-Peroxidase

Die Glutathin-Peroxidase (**GPx**) ist ein selenhaltiges Enzym, welches als Antioxidans im Körper wirkt. Es existieren acht verschiedene Unterformen, wobei nur sechs davon Selen enthalten und nur die dritte Unterform im Plasma zu finden ist.

Bei oxidativen Prozessen im Körper entstehen die sogenannten ROS. Die Glutathionperoxidase hat die Möglichkeit diese ROS zu reduzieren. Sie reagiert mit Wasserstoffperoxiden (H_2O_2), Phospholipidhydroperoxiden und Lipidperoxiden (**ROOH**) zu Wasser und Alkohol.



Abb. 3: Die Rolle von selenhaltigen Enzymen als Antioxidans- Glutathionperoxidase (modifiziert nach M.A.Reeves und P.R.Hoffmann, *The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation*, Cell Mol Life Sci. 2009 August; 66(15): 2457–2478.)



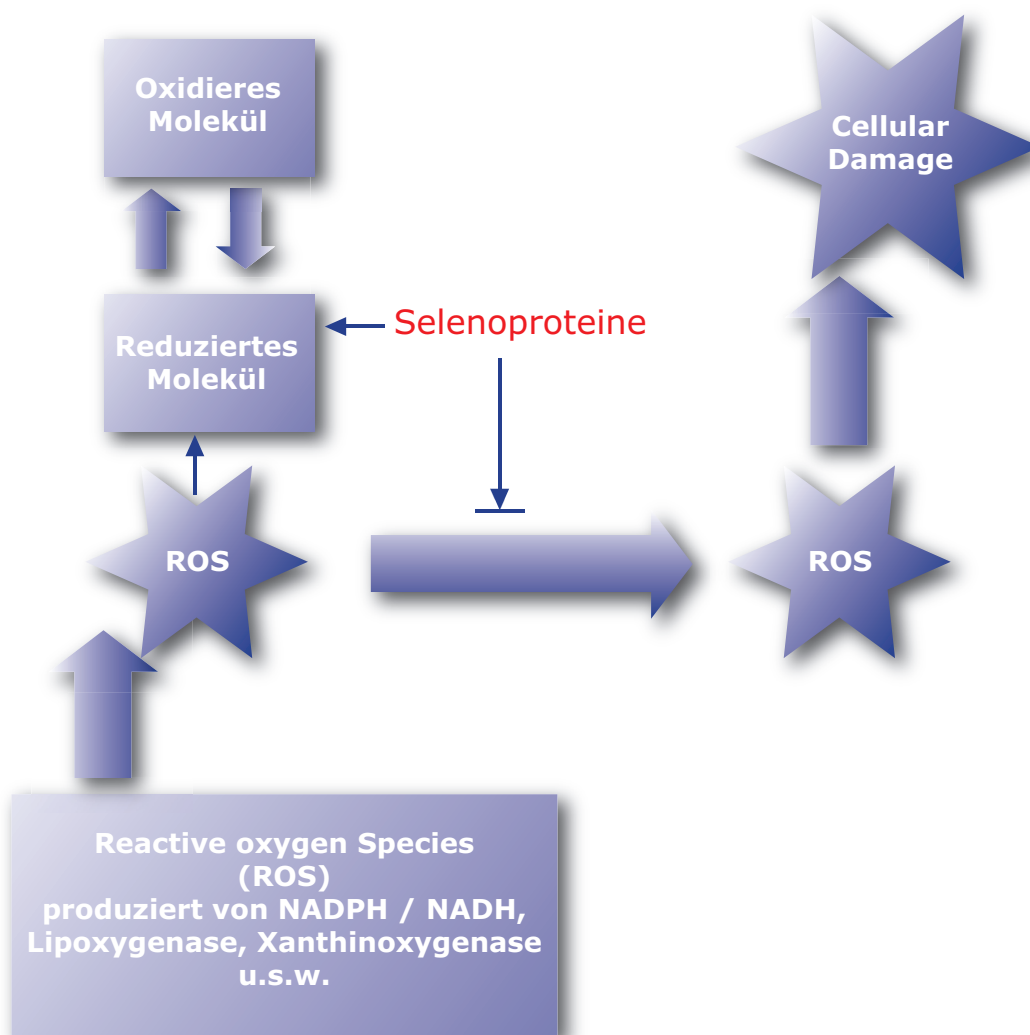


Abb. 4: Die Rolle von selenhaltigen Enzymen als Antioxidans (modifiziert nach M.A.Reeves und P.R.Hoffmann, *The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation*, Cell Mol Life Sci. 2009 August; 66(15): 2457–2478.)

Die GPx 3 enthält 20% - 40% des im Plasma enthaltenen Selens. Diese Unterform wird hauptsächlich in den Nieren, dem Herzen und der Schilddrüse gebildet und spielt eine wichtige Rolle bei Herzerkrankungen.

GPx 1 befindet sich im Zytosol der Zellen. Speziell bei dieser Form fand man heraus, dass ein Anstieg, bzw. Abfall in Verbindung mit Krebs zu bringen ist. Bei *in-vitro*-Versuchen konnte durch die Zugabe von Selen ein Anstieg der GPx 1 erreicht und somit ein vermehrter Schaden an der DNA durch UV-Strahlung verhindert werden.

GPx 2 ist im Epithel des Gastrointestinaltraktes, des Ösophagus und in der Leber zu finden. Bei Selenmangelzuständen scheint die GPx 2 resistenter zu sein als die GPx 1. Außerdem wurde herausgefunden, dass es bei gastrointestinalen Tumoren, zu einer Überexpression von GPx 2 kommt.

GPx 4 ist im Zytosol, den Mitochondrien und dem Zellkern enthalten.

GPx 6 lässt sich im Nasenschleimhautepithel, sowie in embryonalem Gewebe nachweisen (Huang et al., 2012, Reeves and Hoffmann, 2009).

1.4.2.2 Thioredoxin-Reduktase

Die Thioredoxin-Reduktasen besitzen mehrere wichtige Aufgaben. Zum einen sind sie dazu in der Lage inaktives Thioredoxin zu reaktivieren und dadurch die Zellen vor oxydativem Stress zu schützen, zum anderen haben sie die Möglichkeit beim Alterungsprozess der Proteine in einen Deaktivierungszustand zu verfallen (Reeves and Hoffmann, 2009, Huang et al., 2012).

Zur Reduktion von oxidierten Substraten nutzt die Thioredoxin-Reduktase (TrxR) NADPH/H⁺, welches durch die Umwandlung zu NADP⁺ wird. Oxidiertes Thioredoxin ist nicht das einzige Substrat, welches durch die TrxR reduziert werden kann. Selenit ist ein zusätzliches Beispiel für die Reduktion durch die TrxR. Hierbei wird Selenit in H₂Se umgebaut, welches anschließend dem Proteineinbau zur Verfügung steht.



Abb. 5: Die Rolle von selenhaltigen Enzymen als Antioxidans- Thioredoxin-Reduktase (modifiziert nach M.A.Reeves und P.R.Hoffmann, *The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation*, Cell Mol Life Sci. 2009 August; 66(15): 2457–2478.)

Auch bei der Thioredoxin-Reduktase existieren mehrere Unterformen.

TrxR 1 befindet sich im Zytoplasma, sowie im Zellkern. Hier reduziert sie Thioredoxin 1. TrxR 2 befindet sich hauptsächlich in den Mitochondrien, wo sie Thioredoxin 2 reduziert. TrxR 1 und 2 werden unter normalen Bedingungen ausreichend produziert und schützen die Zellen in oxydativen Stresssituationen.

Die TrxR 3 kommt hauptsächlich im Hoden vor. Ihr ist es möglich Thioredoxin und Glutathion zu reduzieren.

Bei Selenmangelzuständen entsteht vermehrt oxidativer Stress, wodurch entzündliche Prozesse gefördert werden (Huang et al., 2012, Reeves and Hoffmann, 2009).

1.4.2.3 Selenoprotein P

Selenoprotein P befindet sich im Plasma und stellt neben der Glutathionperoxidase das wichtigste Selenoprotein dar. Außerdem ist es in Nieren, Hoden und Gehirn vertreten. Der wichtigste Bildungsort ist in der Leber, von wo aus das Protein ins Plasma abgegeben werden kann und systemisch wirkt (Burk and Hill, 2009, Huang et al., 2012).

Selenoprotein P hat den großen Vorteil 10 Selenocysteinreste zu besitzen und kann damit Selen im Plasma binden. Kommt es zu einem Selenoprotein P Mangel, so reichert sich Selen in der Leber an und steht der Versorgung anderer Organe nicht mehr zur Verfügung (G.S., 2006). Selenhaltige Enzyme können nur noch in geringen Mengen gebildet werden und es kommt zu erhöhtem oxydativen Stress (Burk and Hill, 2009, Schomburg et al., 2003).

1.4.2.4 Deiodasen

Die Deiodasen beinhalten ebenfalls Selen in ihrem aktiven Zentrum.

Es existieren drei verschiedene Untergruppen. Die Untergruppen 1 und 2 bewirken den Umbau von T4 zu T3. Dies geschieht über den Außenring an 5'. Eine irreversible Inaktivierung von T3 und T4 ist durch die Deiodase 3 möglich, welche durch den Innenring 5 bewirkt wird. Deiodase 1 besitzt die Fähigkeit der Aktivierung, sowie die Möglichkeit T3 zu inaktivem T2 umzubauen. Damit kann die Deiodase eine Aktivierung und Deaktivierung in Gang setzen.

Deiodase 1 wird vorwiegend in der Leber und den Nieren gebildet. Außerdem konnten Bildungsorte in der Schilddrüse, der Hypophyse, der Plazenta, dem Darm und den Keimdrüsen entdeckt werden. Deiodase 2 wird im ZNS, der Hypophyse, dem braunen Fettgewebe und der Plazenta gebildet (Maia et al., 2011, Reeves and Hoffmann, 2009, Huang et al., 2012, Kohrle et al., 2005). Die Deiodase 3 hat ihren Bildungsort zum größten Teil im ZNS, der Plazenta und dem Feten (Donald L. St. Germain, 2009, Kohrle et al., 2005).

Selenhaltige Proteine im Überblick

Glutathion- Peroxidasen	Vorkommen
GPx1	Zytosol
GPx2	GIT, Ösophagus, Leber
GPx3	Plasma
GPx4	Zytosol, Mitochondrien, Zellkern
GPx6	Nasenschleimhaut, embryonales Gewebe

Thioredoxin- Reduktasen	Vorkommen
TRxR1	Zytoplasma, Zellkern
TRxR2	Mitochondrien
TRxR3	Testes

Deiodasen	Vorkommen
5' D1	Leber, Nieren, Schilddrüse, Plazenta, Keimdrüsen, Darm
5' D2	ZNS, Hypophyse, Braunes Fettgewebe, Plazenta
5 D3	ZNS, Plazenta, Fete

Selenhaltige Proteine im Überblick

Selenoproteine	Vorkommen
SeIP (Selenoprotein P)	Plasma
SeIR (Selenoprotein R)	Gehirn, Zellkern, Zytoplasma
SPS2 (Selenophosphat-Synthetase2)	Testes, Leber, Viele Gewebe
SeIK (Selenoprotein K)	Herz, Skelettmuskeln
SeIM (Selenoprotein M)	Gehirn, Schilddrüse
SeIN (Selenoprotein N)	ER-Membran
SeIS (Selenoprotein S)	Viele Gewebe
SeIV (Selenoprotein V)	Testes
SeIW (Selenoprotein W)	Viele Gewebe
PES (Prostataspezifisches Selenoprotein)	Prostata
SeIH/SeIO/SeIT/SeII (Selenoprotein H, O, T, I)	Viele Gewebe

Abb. 6 und 7: Selenhaltige Proteine im Überblick (modifiziert nach Köhrle et al., Selenium, the thyroid, and the endocrine system, Endocr Rev. 2005 Dec.)

1.4.3 Pharmakologische Wirkung

Tumorentstehung:

Wegen der wichtigen Rolle von Selen als Radikalfänger, wird Selen heute zur Unterstützung bei zahlreichen Erkrankungen verabreicht. Hierzu zählen unter anderem Tumorerkrankungen, kardiovaskuläre Erkrankungen, Sepsis, sowie Schilddrüsenerkrankungen. In verschiedenen Tierexperimenten konnte herausgefunden werden, dass Selen einen großen Einfluss auf die Tumorentstehung hat und damit das Krebsrisiko senken kann (Combs, 1999).

Last et al. konnten bei dem aggressiven Non-Hodgkin-Lymphom den wichtigen Einfluss von Selen als prognostischen Faktor zu Beginn der Therapie erkennen und so das Langzeitüberleben und das Ansprechen auf eine Zytostatikatherapie besser voraussagen (Last et al., 2003).

Radioprotektion:

Rodemann et al. konnten einen Zusammenhang zwischen der Gabe von Natriumselenit und der radioprotektiven Wirkung von menschlichen Fibroblasten an *in-vitro*-Versuchen beweisen. Tumorzellen (Plattenepithelkarzinomzellen) wurden in dieser Arbeit durch Natriumselenit im Zusammenhang mit Strahlentherapie nicht beeinflusst (Rodemann et al., 1999).

Induktion von Apoptose und DNA- Reparaturmechanismen:

Durch die Gabe von Selenmethionin wurde herausgefunden, dass der p53-Wildtyp besser an DNA binden und somit die Apoptose oder die DNA-Reparatur induzieren kann. Diese Ergebnisse wurden lediglich bei gesunden und nicht bei Tumorzellen gefunden (Fischer et al., 2007, Seo et al., 2002, Gudkov, 2002). Eine gesteigerte Bildung von p53 durch Selengabe konnte an Tumorpatienten mit Prostatakarzinom festgestellt werden (Tsavachidou et al., 2009).

Verminderung der Chemoresistenzen:

Caffrey et al. beschrieben den Zustand von vermindertem Glutathion in Tumorzellen bei der Zugabe von Selen in Kombination mit Cisplatin. Dieser Vorgang entsteht laut Caffrey et al. durch eine Bildung von Selendiglutathion (Caffrey and Frenkel, 2000). Durch diese Bildung steht Glutathion der Tumorzelle nicht mehr ausreichend zur Verfügung und führt zu einem Mangel.

Um die Sensibilisierung von Tumorzellen bei Chemotherapie unter Selen Einfluss zu beweisen, wurden Studien an Lymphom-, Mamma- und Prostatakarzinomzellen durchgeführt. Herausgefunden wurde eine verminderte Bildung des Transkriptions-faktors NF-kappaB und in der Folge eine verminderte Zytokinproduktion. Gleichzeitig kam es zu einem Anstieg von Caspase 8 und 9, welche zur Apoptose führten (Beck et al., 2001, Gonzalez-Moreno et al., 2007, Juliger et al., 2007, Last et al., 2006, Li et al., 2008).

Antiinflammation:

Angstwurm et al. konnten einen Zusammenhang zwischen hohen Selendosen und einem besseren Outcome bei schwerer Sepsis und septischem Schock herstellen. Der Zusammenhang zu hohen Blutselenlevelkonzentrationen und Glutathionperoxidase 3 wurde bestätigt und der Zusammenhang von Selen als antiinflammatorische Komponente dargestellt (Angstwurm et al., 2007, Gartner and Angstwurm, 1999). Auch im Bereich der Wundheilung konnte eine Verbesserung durch Zugabe von Selen erzielt werden (Berger et al., 2007).

Kardioprotektion:

Außerdem wurde ein Zusammenhang hergestellt zwischen der Selengabe und dem GPx 1 Anstieg in Endothelzellen des Herzens, wodurch oxidativer Stress vermindert werden kann ([Schnabel et al., 2008](#)).

Immunmodulierung:

In einer randomisierten Studie nach Broome et al. konnte durch die Zugabe von Selen ein Anstieg der Selenkonzentration im Blut, sowie eine erhöhte Aktivität von Glutathionperoxidase nachgewiesen werden. Außerdem wurde eine vermehrte Bildung von verschiedenen Zytokinen und γ -Interferon entdeckt, sowie ein Anstieg an T-Helfer Zellen. Broome et al. postulierten jedoch, dass eine Substitution von mehr als 100 μg Selen pro Tag nötig ist, um eine hinreichende Immunreaktion zu induzieren ([Broome et al., 2004](#)).

Bei einem niedrigen Selenstatus im Blut, scheint das Risiko der Krebsentstehung um ein vielfaches erhöht zu sein ([Salonen et al., 1985](#), [Ujii et al., 1998](#)).

Außerdem scheint ein niedriger Selenspiegel im Blut die Krebsmortalitätsrate zu erhöhen ([Rayman, 2005](#)).

Selen wird zudem eine tumorwachstumshemmende Wirkung zugesprochen ([Brozmanova et al., 2010](#)). Außerdem soll es die Invasion, sowie die Angiogenese in Tumoren hemmen und die Gefahr herabsetzen, an Rezidiven und Metastasen zu erkranken ([Rayman, 2005](#)).

1.4.4 Empfehlungen zur Selenzufuhr

Bei der Empfehlung der Selenaufnahme, betrachtet man den Gehalt in Böden, Dünge- und Futtermitteln. Dieser ist von Land zu Land unterschiedlich ([Larsson and Johansson, 2002](#)) und hängt mit dem unterschiedlichen Selengehalt zusammen. Selenarme Regionen sind in vielen Teilen Europas zu finden. Dazu zählen Deutschland, Finnland, Dänemark, Teile der Balkanländer und Schottland ([G.S., 2006](#)).

Eiweißreiche Nahrung wie Fleisch, Geflügel, Getreide und Nüsse beinhalten viel Selen, wohingegen Obst und Gemüse nur einen geringen Teil zur Selenzufuhr beitragen. Trinkwasser spielt bei der Versorgung in den deutschen Gebieten keine Rolle.

Selenmangelgefährdete Gruppen

<p>Nutritiver Selenmangel</p> <ul style="list-style-type: none">• Veganer• Sondernahrung (PKU)• Einseitige Ernährung (Alkoholiker)• Parenterale Ernährung• Dialyse• Hungerzustand• Anorexia nervosa• Bullimie	<p>Selenmangel wegen Verlusten</p> <ul style="list-style-type: none">• Über Faeces<ul style="list-style-type: none">- Maldigestion- Malabsorption- Diarrhöen- Laxanzienabusus• Über Urin<ul style="list-style-type: none">- Proteinurie bei Nierenschaden- Nephrotisches Syndrom- Negative Stickstoffbilanz- Diabetes insipidus- Diuretika• Über Blutverluste<ul style="list-style-type: none">- Hämorrhoidale Blutungen- Hypermenorrhöen• Über Stillen<ul style="list-style-type: none">- Bei lang anhaltenden Stillperioden
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Abb 8: Selenmangelgefährdete Gruppen (modifiziert nach Selen und Human-Biomonitoring, Stellungnahme der Kommission „Human-Biomonitoring“ des Umweltbundesamtes, Erschienen in: Bundesgesundhbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 45 (2002) 2, 190-195)

Nach Oster et al. liegt in der Bundesrepublik Deutschland die Selenaufnahme bei Frauen um die 38 µg / d und bei Männern um die 47 µg / d, also im Mittel 0,67 µg Selen / kg Körpergewicht (Oster, 1992).

Die deutsche Gesellschaft für Ernährung legt eine empfohlene Selentagesdosis von 30-70 µg/d für Männer und Frauen fest (Ernährung, 2013). Laut Lee et al. wird eine Selenzufuhr von 100 µg/d als optimal betrachtet und empfohlen (Lee and Jeong, 2012). Die WHO-Richtlinien empfehlen einen Mindestbedarf von 30 µg/d für Frauen und 40 µg/d für Männer und die US National Academy of Science eine Zufuhr von 55 µg/d. Für Schwangere und stillende Frauen werden höhere Richtwerte festgelegt, um eine optimale Versorgung zu gewährleisten (SS: 60 µg/d, Stillen: 70 µg/d) (G.S., 2006).

Selenzufuhr laut der Deutschen Gesellschaft für Ernährung

Säuglinge	0 - 4 Monate	5 - 15 µg/d
	4 - 12 Monate	7 - 30 µg/d
Kinder	1 - 4 Jahre	10 - 40 µg/d
	4 - 7 Jahre	15 - 45 µg/d
	7 - 10 Jahre	20 - 50 µg/d
	10 - 13 Jahre	25 - 60 µg/d
	13 - 16 Jahre	25 - 60 µg/d
Erwachsene und Jugendliche	15 Jahre und älter	30 - 70 µg/d
Schwangere		30 - 70 µg/d
Stillende		30 - 70 µg/d

Abb 9: Selenzufuhr laut DGE (modifiziert nach Selen und Human-Biomonitoring, Stellungnahme der Kommission „Human-Biomonitoring“ des Umweltbundesamtes, Erschienen in: Bundesgesundhbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 45 (2002) 2, 190-195)

In epidemiologischen Studien konnte herausgefunden werden, dass die Sterblichkeit verringert werden kann, wenn der Selenspiegel in etwa 135 µg/l misst (Akbaraly et al., 2005, Bleys et al., 2008).

Zur Messung des Selenspiegels werden Plasma- und Vollblutanalysen herangezogen. Der optimale Plasmagehalt beträgt 50-120 µg/l und im Vollblut 60-130 µg/l. Dies kann auf einen höheren Gehalt von Selen in Erythrozyten zurück geführt werden (G.S., 2006).

Selengehalt in Serum und Vollblut

<u>Serum / Plasma Selen</u>	
Erwachsene	50 - 120 µg/l
Kinder	
• 0 - 1 Jahre	33 - 72 µg/l
• 2 - 5 Jahre	32 - 84 µg/l
• 5 - 10 Jahre	41 - 74 µg/l
• 10 - 16 Jahre	40 - 82 µg/l
<u>Selen Serum / Gramm Protein</u>	
Erwachsene	0,77 - 1,15 µg Se/g Protein
<u>Selen Vollblut</u>	
Männer	79 - 130 µg/l
Frauen	60 - 120 µg/l
<u>Selen in Erythrozyten / Gramm Hämoglobin</u>	
Erwachsene	0,2 - 0,6 µg Se/g Hb

Abb 10: Selengehalt in Serum und Vollblut (modifiziert nach Selen und Human-Biomonitoring, Stellungnahme der Kommission „Human-Biomonitoring“ des Umweltbundesamtes, Erschienen in: Bundesgesundhbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 45 (2002) 2, 190-195)

Glutathion-Peroxidase-Aktivität im Serum

Erwachsene	
Männer	127-195 U/L
Frauen	123-167 U/L
Kinder 0-1 Jahre	81-125 U/L
2-5 Jahre	103-149 U/L
5-10 Jahre	91-151 U/L
10-16 Jahre	106-154 U/L

Abb 11: Glutathion-Peroxidase-Aktivität im Serum (modifiziert nach Selen und Human-Biomonitoring, Stellungnahme der Kommission „Human-Biomonitoring“ des Umweltbundesamtes, Erschienen in: Bundesgesundhbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 45 (2002) 2, 190-195)

Die Höchstdosis von Selen wird nach Forceville et al. mit 400 µg/d angegeben, um schädlichen Einflüssen von Selen entgegenzuwirken. 800 µg/d werden als toxisch angesehen. Besteht ein erhöhter oxidativem Stress, sollte eine Dosis über 700 µg/d konsequent vermieden werden (Forceville et al., 2007).

Selen hat eine geringe therapeutische Breite und kann, wie bereits erwähnt, in Konzentrationen über 800 µg/d toxisch wirken. Zu den Symptomen zählen knoblauchartiger Atem, brüchige Nägel und deren Verlust, brüchige Haare und Haarausfall, Zahnverlust und -verfall, Entfärbung der Haut, Schmerzen der Extremitäten, Hyperreflexie, gastrointestinale Beschwerden, Müdigkeit, Erschöpfung und Leistungsschwäche (G.S., 2006).

1.5 Selen und Mammakarzinom

1.5.1 Inzidenz und Mortalität des Mammakarzinoms

Brustkrebs ist eine Erkrankung, welche weltweit von großer Bedeutung ist und wo die Zahl der Neuerkrankungen weiter zunimmt.

Die Inzidenzrate reicht von 19,3/100.000 in Ostafrika bis 89,9/100.000 in Westeuropa. Die Industrienationen sind weit mehr betroffen als die sich langsam entwickelnden Nationen, wobei auch in diesen Regionen ein Anstieg der Inzidenz zu verzeichnen ist.

Die Länder mit den niedrigsten Inzidenzraten sind derzeit Indien, Thailand, China und Afrika.

Die höchsten Inzidenzraten finden sich zur Zeit in Europa und Australien.

Zwischen 1998 und 2002 wurden knapp 1,8 Mio. Brustkrebsfälle weltweit registriert.

Das durchschnittliche Erkrankungsalter bei Mammakarzinom liegt in Europa zwischen 60 und 70 Jahren, wobei die Inzidenz auf 50-64 Jahre abfällt. In Asien kann ein durchschnittliches Alter von 40-50 Jahren verzeichnet werden und in den USA liegt die Erkrankungsrate bei 22% zwischen 45 und 54 Jahren und bei 24% zwischen 55 und 64 Jahren.

33% der europäischen Bevölkerung leidet unter der Erkrankung Mammakarzinom. Dabei wurden zwischen 1998 und 2002 420.800 Fälle beschrieben und eine Sterberate von 129.300 festgehalten.

Breast cancer incidence in Europe

Population	Cases	Crude rate	ASR
Germany, Munich (1998-2002)	8997	149,8	84,9
Norway (1998-2002)	12521	110,2	71
Russia, St. Petersburg (1998-2002)	10556	82,3	47,7
Switzerland Vaud (1998-2002)	2547	160,1	99,1
UK, Scotland (1998-2002)	17137	130,2	79,2
Spain, Basque Country (1998-2001)	4454	104,4	64,3
France, Loire-Atlantique (1998-2002)	4278	144,1	98,1

Abb.12: Brustkrebsinzidenz in Europa (Modifiziert nach Curado, M. P., Breast cancer in the world: incidence and mortality, 2011, Salud Publica Mex)

Das Mammakarzinom steht an fünfter Stelle der wichtigsten zum Tode führenden Krebserkrankungen weltweit und ist die häufigste zum Tode führende Erkrankung der Frau.

In Europa besteht die höchste Mortalitätsrate in Dänemark, den Niederlanden und Irland, wohingegen die niedrigsten Raten in Finnland, Spanien und Bulgarien zu finden sind (Curado, 2011).

1.5.2 Ätiologie des Mammakarzinoms

Risikofaktoren für das Entstehen eines Mammakarzinoms sind zum einen hormonelle Einflüsse (Parität, Stillen, Alter bei der ersten Geburt, Alter der Menarche, hormonelle Therapien), Ernährung und Lebensführung (Alkohol, hoher BMI), sowie eine familiär, genetische Komponente. Die tatsächliche Ätiologie ist unbekannt. Eine multifaktorielle Genese wird vermutet.

Über 90% der Erkrankungen entstehen spontan und nur 5% sind einer genetischen Herkunft zuzuordnen. Liegt ein hereditäres Mammakarzinom vor, so tritt bei diesen Patienten die Erkrankung meist früh und häufig bilateral auf. Die Häufung von anderen Krebserkrankungen wie Ovarial-Ca, Magen-Darm-Ca, Bronchial-Ca, Pankreas-Ca, Nieren-Ca, Blasen-Ca und Leukämien sind bei diesen Patienten vermehrt zu beobachten.

Die Brustkrebsgene BRCA1 (Chromosom 17q21) und BRCA2 (Chromosom 13q12-13) treten häufig bei der vererbten Form des Mammakarzinoms auf. Es besteht ein lebenslang erhöhtes Risiko für Brust- oder Ovarialkarzinom bei Existenz dieser Mutation (Kiechle, 2011).

Die häufigste Lokalisation des Mammakarzinoms ist der äußere obere Quadrant. Seltener befindet es sich im oberen inneren, untern äußeren, unteren inneren Quadranten oder retromamillär. Es besteht die Möglichkeit, dass mehrere dysplastische Herde in einem Quadranten oder verteilt in mehreren Quadranten auftreten.

Zur bestmöglichen Behandlung müssen diverse Kriterien herangezogen werden, um die Malignität des Tumors eruieren zu können. Dazu zählen der Menopausenstatus, das histologische Grading, die TNM- Klassifikation, und der Hormonrezeptorstatus.

Histologisch unterscheidet man ein duktales, von den Milchgängen ausgehendes, von einem lobulären, dem Drüsengewebe ausgehendem Mammakarzinom.

Das duktales Karzinom (70-80%) tritt weitaus häufiger auf und gilt als aktive Vorstufe des invasiven duktales Mammakarzinoms, mit einer hohen Wahrscheinlichkeit zu entarten. Die Vorstufen zu diesen beiden Karzinomformen werden DCIS (intraduktal) und CLIS (intralobulär) genannt. Weitere, sehr selten auftretende histologische Unterformen, neben dem duktales und lobulären Mammakarzinom, sind medulläre (5%), tubuläre (2%), muzinöse (2%) und pilläre (1%) Formen. Als besonders aggressiv gelten das inflammatorische Mammakarzinom und der Morbus Paget, welcher sich primär an der Mamille manifestiert.

Eine weitere wichtige histologische Abgrenzung ist das Grading. Es beurteilt den Differenzierungsgrad der Zellnuclei, die Mitose, sowie tubuläre Veränderungen. Mit diesen Kriterien können laut Bloom und Richardson drei Differenzierungsgrade eingeteilt werden.

Grad 1 ist gut (low grade), Grad 2 mäßig (intermediate grade) und Grad 3 schlecht (high grade) differenziert (H.J.G.Bloom, 1957, C.W.Elston, 1991).

Die Einteilung des Mammakarzinoms kann mittels der TNM-Klassifikation getroffen werden (UICC 2002). Hierbei wird der Tumordurchmesser (T), der Lymphknotenbefall (N), sowie der Metastasierungsgrad (M) beurteilt. Ein intra- und postoperatives Staging nach dieser Klassifikation ist unausweichlich und von großer Bedeutung (Kiechle, 2011).

TNM Klassifikation

Primärtumor		
pTx		Primärtumor nicht beurteilbar
pT0		Kein Anhalt für Primärtumor
pTis		Karzinoma in situ
	pTis (DCIS)	Ductales Karzinoma in situ
	pTis (LIS)	Lobuläres Karzinoma in situ
	pTis (Morbus Paget)	Paget Erkrankung ohne erkennbaren Tumor
pT1		Tumor 2 cm oder weniger
	pT1mic	Mikroinvasion von 0,1 cm oder weniger
	pT1a	Mehr als 0,1 cm, aber nicht mehr als 0,5 cm
	pT1b	Mehr als 0,5 cm, aber nicht mehr als 1 cm
	pT1c	Mehr als 1 cm, aber nicht mehr als 2 cm
pT2		Mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm
pT3		Mehr als 5cm
pT4		Tumor jeder Größe mit direk- ter Ausdehnung auf Brust- wand oder Haut
	pT4a	Ausdehnung auf die Brustwand
	pT4b	Mit Ödem, Ulzeration der Brusthaut oder Satelliten- metastasen der Haut der gleichen Brust
	pT4c	Kriterien pT4a und pT4b gemeinsam
	pT4d	Inflammatorisches Karzinom
Regionäre Lymphknoten		
pNx		Keine Beurteilung der regionären Lymphknoten möglich
pN0		Keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1		Metastasen 1-3 ipsilaterale Lymphknoten entlang der A. mamaria interna mit mikroskopischen Metastasen,

		die bei der Sentinallymphknotendisektion entdeckt, aber nicht klinisch erkannt wurden.
	pN1mic	Mikrometastase (größer 0,2 mm, aber nicht größer als 2 mm)
	pN1a	Metastasen 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten, mit mindestens einer größer als 2 mm
	pN1b	Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischen Lymphknoten, die bei der Sentinallymphknotendisektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch erkennbar waren
	pN1c	Metastasen 1-3 ipsilateraler axillärer Lymphknoten und ipsilateraler Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischen Metastasen, die bei der Sentinallymphknotendisektion erkannt wurden, aber klinisch nicht erkennbar waren
pN2		Metastasen 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
	pN2a	Metastasen 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten, mindestens eine größer 2 mm
	pN2b	Metastasen klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
pN3		Metastasen in mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten, oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten, oder in klinisch erkennbaren Lymphknoten

		entlang der A. mammaria interna mit mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase, oder mehr als 3 axilläre Lymphknotenmetastasen mit klinisch nicht erkennbaren mikroskopisch nachweisbaren Metastasen in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, oder Metastasen in ipsilateralen supraclavikulären Lymphknoten
	pN3a	Metastasen in mind. 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten (mind. einer größer 2 mm) oder in ipsilateralen infraclavikulären Lymphknoten
	pN3b	Metastasen in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei Vorliegen von mind. einer axillären Lymphknotenmetastase oder Metastasen in mehr als 3 axillären Lymphknoten und in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, nachgewiesen durch Sentinallymphknotendisektion, aber nicht klinisch erkennbar
	pN3c	Metastasen in ipsilateralen supraclavikulären Lymphknoten
Fernmetastasen		
Mx		Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0		Keine Fernmetastasen
M1		Fernmetastasen

Tab.1: TNM-Klassifikation (Modifiziert nach Kiechle, Gynäkologie und Geburtshilfe, 2011, 2.Auflage, Elsevier GmbH, Urban und Fischer München)

Das Mammakarzinom metastasiert zunächst vorwiegend lymphogen und breitet sich dann hämatogen weiter aus. Bei der lymphogenen Metastasierung kommt es zu einer Besiedelung im Bereich der Axilla, sowie infra- und supraclavikulär. Hämatogen streuen die Zellen vorwiegend in Knochen, Lunge, Leber, Zentralnervensystem und Ovarien.

Der Hormonrezeptorstatus ist ebenfalls ein wichtiger Faktor. Ist dieser positiv, können Steroidhormone an den Rezeptor binden und die Tumorzelle zur Proteinsynthese, Zellproliferation und Differenzierung anregen (Fernandez et al., 2006, Horwitz et al., 1978).

1.5.3 Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms

Zur Diagnostik des Mammakarzinoms sind insbesondere die Inspektion und Palpation von großer Bedeutung.

Als weiterer wichtiger diagnostischer Schritt gilt die Mammographie. Mit dieser können Malignitätsfaktoren, wie Mikroverkalkungen, radiologische Herdbefunde oder Veränderungen von Drüsen, Gängen und Gefäßen, erkannt werden.

Eine untergeordnete Rolle spielen die Sonographie und die MRT-Bildgebung (Magnetresonanztomographie).

Die Biopsie ist ein wichtiges diagnostisches Mittel zur Bestimmung des histologischen Typs, zum Grading oder für immunhistochemische Färbungen, welche den Hormonrezeptorstatus des Tumors kennzeichnen (Kiechle, 2011).

Wichtig bei der Therapie des Mammakarzinoms sind lokale, sowie systemische Methoden. Die Operation ist die wichtigste lokale Maßnahme und wird, mit Ausnahme des inflammatorischen und exulcerierenden Mammakarzinoms, immer primär kurativ angewandt. Hierbei unterscheidet man zwischen brusterhaltender Therapie (BET) und radikaler Mastektomie.

Beim therapeutischen Ansatz mittels BET, welche bis 3 cm Tumordurchmesser durchgeführt werden kann, wird der Tumor mit ausreichendem Randsaum im Gesunden, sowie axillären Lymphknoten entfernt und die Brust nachhaltig bestrahlt.

Die radikale Mastektomie besteht in einer vollständigen Entfernung des Drüsenkörpers mit axillären Lymphknoten und Pektoralisfaszie. Sie sollte nur durchgeführt werden, wenn keine BET mehr möglich ist, da eine Mastektomie keinen erhöhten Überlebensvorteil bietet (Umberto Veronesi, 2002, October 17, G. W. Kauffmann, 2006, Kiechle, 2011).

Eine weitere lokale Therapiemaßnahme stellt die Strahlentherapie dar, deren Stellenwert in der Bestrahlung bei BET sehr hoch ist und nach jeder brusterhaltenden Therapie statt findet (G. W. Kauffmann, 2006). Nach radikaler Mastektomie kann eine Bestrahlung in Erwägung gezogen werden, wenn der Tumor über 3 cm misst, eine Lymphangiosis besteht, keine Resektion im Gesunden möglich ist, oder mehr als 3 Lymphknoten befallen sind (Kiechle, 2011).

Die Dosis bei BET beträgt 50 Gy und wird in 1,8 Gy Dosen 5mal pro Woche verabreicht. Bei Bestrahlung des Lymphabflusses und nach Mastektomie werden 50 Gy mit 1,8-2,0 Gy Einzeldosen angewandt (G. W. Kauffmann, 2006). Die Einzeldosen werden ebenfalls für eine bessere Regenerationsfähigkeit des gesunden Gewebes eingesetzt (Jan Olof Strömbeck, 1987).

Zu den systemischen Methoden zählen die adjuvante und neoadjuvante Therapie des Mammakarzinoms. Diese bestehen aus endokrinen Methoden oder der Chemotherapie. Ihr Ziel ist es, noch vorhandene Brustkrebszellen zu eliminieren (Kiechle, 2011).

Die endokrine Antihormontherapie kann nur angewandt werden, wenn der Tumor hormonrezeptorpositiv ist (70-80% aller Mammatumoren). Zu den Substanzen zählen Tamoxifen, GnRH-Analoga und Aromataseinhibitoren.

Besteht ein positiver HER2 Status, kann in der adjuvanten Therapie der humanisierte monoklonale Antikörper Trastuzumab eingesetzt werden. Dieser vermindert das Rezidivrisiko um die Hälfte.

Chemotherapeutika, wie Anthrazykline und Taxane, werden bei axillärem Lymphknotenbefall oder bei schlechten prognostischen Faktoren (z.B. G3) der Patienten eingesetzt (Kiechle, 2011).

Inflammatorische und exulcerierende Mammakarzinome werden meist mit einer Kombination aus lokalen und systemischen Methoden (Strahlen- und Chemotherapie) behandelt.

1.5.4 Strahlentherapie im Zusammenhang mit Selen

Bei der Strahlentherapie entstehen durch die Ionisation der Moleküle ROS. Diese bewirken Schäden an der DNA, wie Einzel- und Doppelstrangbrüche. Außerdem starten sie peroxidative Kettenreaktionen und inaktivieren Enzyme. Folglich kommt es zu zahlreichen Zelluntergängen. Entstehen ROS bei der Bestrahlung im Tumorgewebe, so wird dieses effektiv zerstört. ROS können auch das umliegende gesunde Gewebe (Normalgewebe) schädigen und können eine Induktion in Tumorgewebe hervorrufen (Franca et al., 2011, Borek, 2004).

Selen bewirkt durch seinen antioxidativen Effekt einen Schutz des Normalgewebes (Rodemann et al., 1999) und reduziert Nebenwirkungen der Strahlentherapie. Die Strahlentherapie selbst bewirkt ein Absinken des Selenspiegels, wodurch vermehrt oxidativer Stress entsteht. Dieser oxidative Stress produziert einen Anstieg von akuten Nebenwirkungen (Borek, 2004).

Ein protektiver Effekt von Selen konnte auch in der Kombination von Strahlen- und Chemotherapie nachgewiesen werden. Hier konnte eine geringere Nebenwirkungsrate und dadurch eine gesteigerte Lebensqualität während der Behandlung erzielt werden (Rodemann et al., 1999, Buntzel et al., 2010, Hehr et al., 1997, Last et al., 2003).

1.5.5 Mammakarzinom im Zusammenhang mit Selen

Zum heutigen Zeitpunkt und mit den bisherigen Forschungsergebnissen ist bekannt, dass Patienten mit verschiedensten Krebserkrankungen einen geringeren Anteil an antioxidativen Proteinen im Blut aufweisen. Dies gilt auch für das Mammakarzinom, was sich mit dem Selenspiegel im Blut in Verbindung bringen lässt (Pawlowicz et al., 1991).

In einer Studie von Lopez-Saez et al. wurde der Selenspiegel von Brustkrebspatientinnen, mit dem von gesunden Frauen und Frauen mit chronischen Erkrankungen verglichen. Man konnte feststellen, dass der Selenspiegel in Kombination mit Brustkrebs signifikant erniedrigt war ($p < 0,001$) (Lopez-Saez et al., 2003).

Außerdem wurde gezeigt, dass der Selenstatus bei Patienten mit Mammakarzinom, welche sich einer Strahlentherapie unterziehen, weiter sinkt (Franca et al., 2011).

Die Mutation von BRCA1 stellt einen sehr wichtiger Faktor für die hereditäre Entstehung von Ovarial- und Mammakarzinom dar, da BRCA1 an der Reparatur von DNA Schäden beteiligt ist. Mutiert das BRCA1-Gen, so entsteht vermehrt oxidativer Stress und ein erhöhtes Risiko der Tumorbildung (Dziaman et al., 2009, Kowalska et al., 2005).

Kowalska et al. konnten belegen, dass durch die Zugabe von Selen bei Patientinnen mit BRCA1-Mutation, das Risiko von Chromosomenbrüchen auf ein Level von Nicht-Erkrankten gesenkt werden kann (Kowalska et al., 2005).

Jiang et al. diskutierten weitere Aspekte der Selenwirkung: Selen als Angiogenesehemmer oder Selen als Reduktionsfaktor der Gefäßdichte im Tumor (Jiang et al., 1999).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Selen in seiner Wirkung als Antioxidans ist heute kaum mehr aus der Krebstherapie weg zu denken. Zahlreiche Patienten nehmen Selenpräparate, zusätzlich zu ihren Behandlungen ein, um Nebenwirkungen der Therapie zu reduzieren. Durch die oben beschriebenen Studien ist bekannt, dass Selen als Antioxidans zahlreiche positive Effekte bei chronischen Erkrankungen, verschiedenen Krebsleiden und inflammatorischen Prozessen haben kann. Die bisherigen Studienergebnisse deuten also eher auf einen positiven Effekt von Selen in der Strahlentherapie hin.

Auch in Zusammenhang mit Brustkrebs wurden bisher eher positive Auswirkungen von Selen gezeigt. Es konnte oxidativer Stress in gesundem Gewebe vermindert werden.

Allerdings könnte Selen nicht nur das gesunde Gewebe bei Mammakarzinom beeinflussen, sondern auch Auswirkungen auf die Tumorzellen haben. Es besteht, im Zusammenhang mit Bestrahlung die Möglichkeit, dass durch Selen nicht nur das gesunde, sondern auch das kranke Gewebe geschützt werden könnte und somit der Effekt, den eine Bestrahlung im Tumorgewebe verursacht, abmildern könnte.

In diesem Fall müsste eine Selensubstitution während einer Strahlentherapiebehandlung bei Mammakarzinom dringend überdacht und neu bewertet werden.

Um diesen möglichen Zusammenhang aufzuklären wurden drei verschiedene Brustkrebszelllinien ausgewählt. In Kombination von unterschiedlichen Selenkonzentrationen mit und ohne Bestrahlung wurde mit *in-vitro*-Versuchen getestet, ob Selen im Zusammenhang mit Bestrahlung, eine Wirkung auf Brustkrebszellen hat und diese eventuell beeinflusst.

2 Material und Methoden

2.1 Materialverzeichnis

Chemikalien und Lösungen	Hersteller
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Invitrogen
Alexa Fluor 555 goat anti-mous IgG (H+L)	Invitrogen
Annexin-V-Fluos	Roche Diagnostics GmbH
Anti-phospho-Histone H2AX (Ser 139) Clone. JBW 301 (mouse monoclonal IgG)	Millipore
BD Cell Tack™ Tissue Adhesive	BD Biosciences Pharmingen
BD Cytotfix/Cytoperm™	BD Biosciences Pharmingen
BD Perm/Wash™ Buffer	BD Biosciences Pharmingen
BD Pharmingen Annexin V Binde Puffer	BD Biosciences Pharmingen
BD Pharmingen™ (FITC Rabbit-Anti-Active-Caspase-3)	BD Biosciences Pharmingen
BSA (Bovines Serumalbumin)	PAA
Crystal Violett 0,25%	Apotheke, Klinikum Rechts der Isar
DPBS (Phosphate Buffered Saline)	GIBCO
FCS (inaktiviert)	Biochrom AG
Glycin	SIGMA-A LDRICH Chemie GmbH
Hepes 1M, Buffer Solution	Invitrogen
L-Glutamine	PAN Biotech GmbH
Methanol	Apotheke, Klinikum Rechts der Isar
NaCl 0,9%	Merck Schuchardt OHG
pAb anti 53 BP1 Antibody	Novus
Paraformaldehyd	Merck Schuchardt OHG
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Propidium Iodide (PI)	Millipore
RPMI 1640	Invitrogen
Selenase 100µg pro injectione (Natrium-selenit-Pentahydrat 100µg Selen in 2ml Injektionslösung)	Biosyn Arzneimittel GmbH

Sodium/Natrium-Pyruvate	PAN Biotech GmbH
Triton X-100	SIGMA- ALDRICH Chemie GmbH
Trypan Blue Solution	Fluka Analytical
Trypsin EDTA Solution	PAN Biotech GmbH
Vectashield/DAPI	Vector Laboratories
Materialien bzw. Reagenzien	Hersteller
15 ml Polystyrene Round-Bottom Tube	BD Falcon
225 ml Graduated Colonial Tube with Cap	Becton Dickinson and Company
5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube	BD Falcon
Cellstar Tubes 50 ml	Greiner bio one
Clear Multiple Well Plate 12 well	Corning
Corning Flash with Cap 25 cm ²	Biochrom AG
Corning Flash with Cap 75 cm ²	Biochrom AG
Einwegpipette (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	SARSTEDT
Eppendorf Research Pipette (1 µl, 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf Zentrale
Lab Tek Camber Slide w/Cover	Nalgene Nunc International
Save-Seal Tubes 2 ml	SARSTEDT
Standard Pipettenspitzen	SARSTEDT
TPP Zentrifugenröhrchen konisch (15 ml)	TPP AG
Ultra -Low-Cluster 96 well	Costar
Geräte	Hersteller
Axio Vision Dokumentation Software	Carl Zeiss GmbH
Axioskop 2 plus	Carl Zeiss GmbH
Axiovert 25 Mikroskop	Carl Zeiss GmbH
Bioreader DE- Software	Biosys
Bioreader [®] 3000	Biosys
Cell-Quest-Pro-Software	Biosys
CO ₂ Inkubator BBD 6220	Thermo SCIENTIFIC
Facscalibur (FACS)	Becton Dickinson
Feinwaage EW 620-3NM	Kern
Lamin Air LB48L	Heraeus
Röntgenbestrahlungsgerät RS225A	Gulmay Medical Ltd
R-Programm (Ri386 3.0.1)	GNU General Public License
Stereomikroskop Stemi 2000-C mit Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Carl Zeiss GmbH
Thermo Scientific Megafuge 1.OR	Heraeus
Vortex Genie 2™	Bender+ Hobein AG
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Electron Corporation

Tab.2: Materialliste

2.2 Zelllinien und Zellkultur

In dieser experimentellen Arbeit wurden drei verschiedene Brustzelllinien für die *in-vitro* Versuche verwendet.

Bei der ersten Zelllinie handelt es sich um MCF-7 Zellen. Diese wurden 1970 zum ersten Mal bei einer 69 Jahre alten Patientin entdeckt und isoliert. Die Zelllinie wurde nach der „Michigan Cancer Foundation-7“ benannt. MCF-7 Zellen haben eine Sensibilität gegenüber Zytokeratin und die Fähigkeit Östrogenrezeptoren zu exprimieren. Außerdem besteht die Fähigkeit zur Kuppelformung und Molekularschichtbildung (Inc., 2010-2012).

Die T47D Zelllinie wurde 1979 bei einer 54 jährigen Patientin mit duktalem Mammakarzinom entdeckt. Diese Zellen besitzen Rezeptoren für 17-Beta Östrogen, Calcitonin und weitere Steroide. Außerdem besitzen sie eine gute Koloniebildungsfähigkeit und sind in der Lage Molekularschichten zu formen (Inc., 2010-2011).

MDA- MB 231 stand als dritte Brustkrebszellreihe in dieser Arbeit zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um Zellen, welche 1973 am „M.D. Anderson Cancer Center“ isoliert wurden. Die MDA- MB 231 Zellen besitzen eine spindelförmige Gestalt und sind sehr invasiv. Auch diese Zelllinie hat die Fähigkeit zur guten Koloniebildung. Versuche an Mäusen zeigten eine rasche Tumorentwicklung und Metastasenbildung (Inc., 2009-2011).

Alle drei Zelllinien wurden in RPMI 1640 unter Standardbedingungen kultiviert. Zu den Bestandteilen des Mediums zählen 10 % FCS (fetal calf serum), L-Glutamine 1:100, Penicillin/Streptomycin 1:100, Sodium/Natrium-Pyruvate 1:100 und Hepes 1:100. Alle durchzuführenden Schritte an der Zellkultur fanden unter der Sterilwerkbank Lamin Air LB48L statt.

Zur Inkubation wurden die Zellen bei einer konstanten Temperatur von 37° C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem Kohlendioxidgehalt von 5 % in einem Inkubator kultiviert. Um ein Konfluieren der Zellen zu verhindern, wurden die Zellen alle 3-4 Tage passagiert.

Ablauf der Subkultivierung:

- o MCF-7 1:6
- o Inkubationszeit bei 37° C, 2 min 30 sek
- o Zugabe von 3 ml Trypsin EDTA Solution

- o T47D 1:4
- o Inkubationszeit bei 37° C, 3 min 30 sek
- o Zugabe von 2 ml Trypsin EDTA Solution

- o MDA-MB-231 1:10
- o Inkubationszeit bei 37° C, 1 min 30 sek
- o Zugabe von 5 ml Trypsin EDTA Solution

- o Altes Medium entfernen
- o Den Zellrasen mit 20 ml DPBS (Phosphate Buffered Saline) waschen
- o Zur Ablösung der Zellen wird Trypsin EDTA zugegeben und die Zellen bei 37° C inkubiert
- o Resuspension der gelösten Zellen in Medium
- o Zellkulturflaschen à 75 cm² (Corning Flash with Cap 75 cm²) mit jeweils 20 ml frischem Medium füllen und 0,5 ml der gelösten Zellen aussäen

2.3 Messung zur Induktion der Apoptose mit Annexin-PI-Färbung

Der programmierte physiologische Zelltod im Körper wird Apoptose genannt und durch die Zelle selbst hervorgerufen. Sie steht der Nekrose, der sogenannten zweiten Form des Zelltodes, entgegen. Die Nekrose geht mit einer Zellschwellung und Entzündungsreaktion einher, wohingegen die Apoptose ohne Entzündungsreaktion abläuft. Dabei zerfällt die Zelle und kann phagozytiert werden. Die Apoptose wird eingeteilt in einen extrinsischen und intrinsischen Weg und benötigt zahlreiche Mediatoren wie Caspasen, die den Ablauf der Apoptose ermöglichen ([Joachim Rassow, Stuttgart, Juli 2008](#)).

Die Annexin-PI-Färbung misst die Apoptose zu einem frühen Zeitpunkt. Mit Beginn des apoptotischen Vorgangs entsteht ein asymmetrisches Verhältnis zwischen Phospholipiden der Cytoplasmamembran. Bei lebenden Zellen befindet sich das sogenannte Phosphatidylserine (PS) auf der Innenseite der Cytoplasmamembran. Gehen die Zellen in Apoptose, findet man Phosphatidylserine (PS) auf der äußeren Cytoplasmamembran. Annexin-V-Fluos ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und bindet an Phosphatidylserine von apoptotischen und teilweise auch nekrotischen Zellen ([Gallardo Bolanos et al., 2012](#)).

PI, welches im roten Bereich fluoresziert, dient zur Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen. Er bindet an die DNS und ist somit nur in toten nekrotischen Zellen aufzufinden. Ein Eindringen in Zellen mit intakter Membran ist nicht möglich ([van Engeland et al., 1998](#)).

Annexin-V-Fluos und Propidium Iodide (PI) machen somit die Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose möglich.

Für die Annexin-PI-Färbung wurden pro Zelllinie 8 Zellkulturflaschen à 25 cm² (Corning Flash with Cap 25 cm²) vorbereitet:

- o Kontrolle
- o 10 Gy
- o 70 µg/l Selen
- o 140 µg/l Selen
- o 400 µg/l Selen
- o 10 Gy und 70 µg/l Selen
- o 10 Gy und 140 µg/l Selen
- o 10 Gy und 400 µg/l Selen

Zur Bestimmung der Apoptosefähigkeit der Zellen unter Seleneinfluss und nach Bestrahlung, wurden diese zunächst in 5 ml Medium in Zellkulturflaschen à 25 cm² nach tumorzelllinienspezifischer Ausgangskonzentration, angesetzt. Im Anschluss an diesen Vorgang, wurde Selenase 100 µg pro Injektion (Natriumselenit-Pentahydrat 100 µg Selen in 2 ml Injektionslösung, biosyn Arzneimittel GmbH, Fellbach), in entsprechender Konzentration und in die dafür vorgesehenen Zellkulturflaschen hinzupipettiert und für 24 Stunden bei 37° C inkubiert.

Nach 24 stündiger Inkubation unter Seleneinfluss, wurden die zu bestrahlenden Zellen bei 10 Gy mit 200 kv Röntgenstrahlung behandelt (Gulmay Bestrahlungsanlage RS225A, 500 mm Abstand, 200 kV, 15 mA, 0,5 mm Kupfer) und danach erneut für 72 Stunden bei 37°C inkubiert.

Für die Annexin-PI Färbung wurde nach 72 Stunden zunächst das Medium jeder Zellkulturflasche à 25 cm² abpunktiert. Dann wurde der Zellrasen mit DPBS gewaschen und zur Lösung der Zellen, 0,5 ml Trypsin EDTA Solution pro Flasche zugegeben. Danach wurden die Zellen, zelllinienspezifisch, inkubiert.

Nach der Inkubation und Resuspension der gelösten Zellen wurde je Flasche 2 ml Medium hinzupipettiert und anschließend 10 µl pro Flasche entnommen und mit jeweils 10 µl Trypan Blue Solution in einer Ultra-Low-Cluster 96 well Platte vermischt. Nach der Vermengung, wurden die Zellen unter einem Axiovert 25 Mikroskop ausgezählt.

Mit folgenden Formeln konnte nun die entsprechende Menge Zellsuspension pro Flasche errechnet werden.

$$Z = \frac{a}{q} \times 2 \times 10000 \times M$$
$$200000 / Z$$

- o **Z** = Zellzahl insgesamt
- o **A** = Summe der in den Zählquadranten gezählten Zellen
- o **q** = Anzahl ausgezählter Zählquadranten
- o **M** = Menge des Mediums (in der die Zellen aufgenommen wurden)
- o **2** = Faktor zur 1:1 Verdünnung mit Trypanblau
- o **10000** = vordefiniertes Volumen der Zählkammer
- o **200000** = Anzahl der auszusäenden Zellen

Die doppelte Menge der errechneten Zellmenge wurde nun auf zwei 2 ml Safe-Seal Tubes aufgeteilt.

Die Tubes wurden 3 min, in der Zentrifuge Heraeus Fresco 17 bei 5 RPM zentrifugiert, wodurch sich ein Zellpellett bildete. Der zellfreie Überstand wurde verworfen und die Zellen mechanisch resuspendiert und mit DPBS gewaschen und danach nochmals zentrifugiert. Erneut wurde der zellfreie Überstand verworfen und das Pellet in Annexin-Bindepuffer (1 ml Pharmingen Annexin V Binde Puffer pro 9 ml steriles H₂O) resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation, Verwerfung des Überstandes und Resuspendierung der Zellen wurde nun in eines der beiden Tubes 100 µl Annexinfärbepuffer (5 µl Annexin-V-Fluos pro 500 µl Annexin-Bindepuffer) eingebracht. Dieses Tube wurde für 15 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit, inkubiert.

Danach wurde jedes Tube mit 400 µl Annexinbindepuffer aufgefüllt und in ein 5 ml Polystyrene Round-Bottom-Tube umgefüllt.

Vor der Messung am Facscalibur (FACS) wurde in jede Tube 5 µl Propidium Iodide (PI) eingebracht und gut durchgemischt. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch gemessen und mittels der Cell-Quest-Pro-Software analysiert.

Die Annexin/PI Durchflusszytometrie unterscheidet zwischen lebenden, nekrotischen und apoptotischen Zellen. Der linke untere Quadrant repräsentiert lebende Zellen und der linke obere Quadrant die Zellen mit undifferenzierter Beschädigung. Im rechten unteren Quadranten werden die apoptotischen Zellen angezeigt, wohingegen rechts oben die nekrotischen repräsentiert werden (He et al., 2013a).

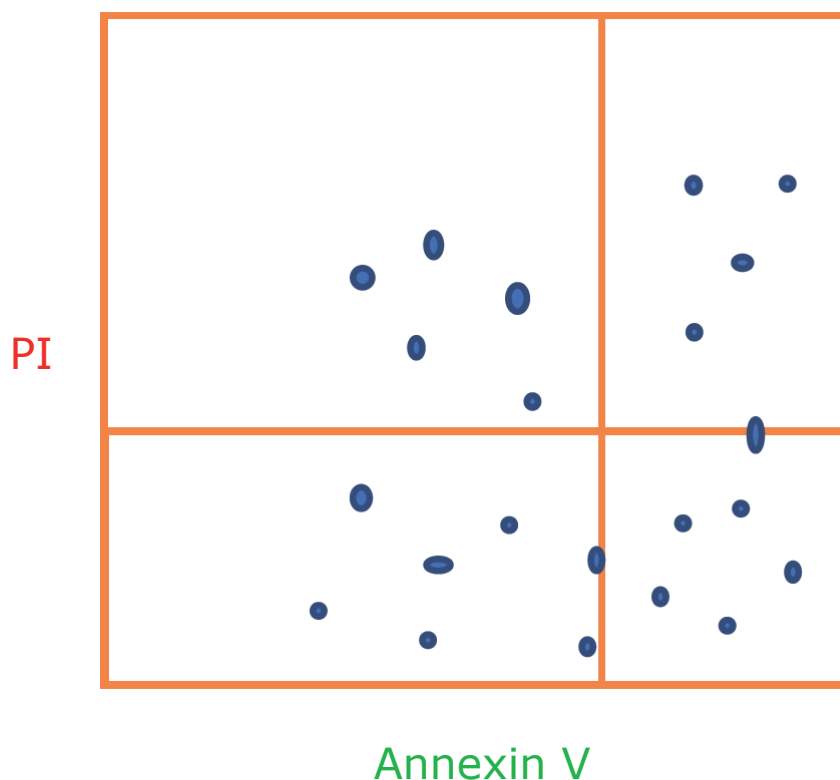


Abb.13: Schema einer Annexin-PI- Messung

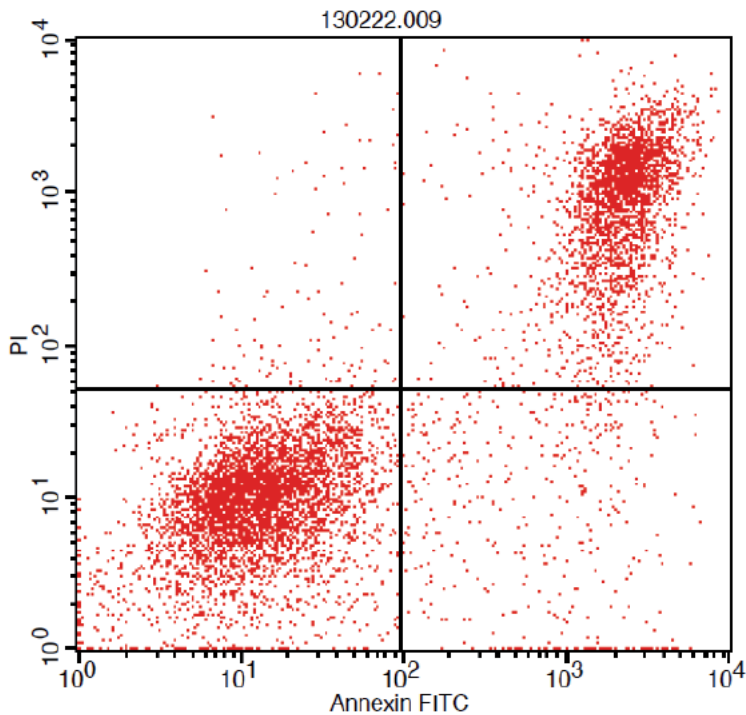


Abb.14: Originaldarstellung einer Annexin-PI-Messung aus eigener Datenerhebung

2.4 Messung zur Induktion der Apoptose mit FITC-Aktiv-Caspase-3-Färbung

Caspasen sind wichtige Mediatoren im Ablauf der Apoptose. Man unterscheidet Initiator- Caspasen von Effektor-Caspasen. Initiator-Caspasen sind mitunter an der Auslösung der Apoptose beteiligt, wohingegen Effektor-Caspasen zur proteolytischen Spaltung und zum Zelltod führen ([Joachim Rassow, Stuttgart, Juli 2008](#)). Caspase 3 zählt zu den Effektor-Caspasen. Ihre Aktivierung findet zu einem späteren Zeitpunkt statt als die Membranasymmetrie, welche durch die Annexin-PI-Färbung gemessen wird. Durch das Binden von immunfluoreszenzmarkierten Antikörpern an Caspase 3 kann die Apoptoserate im Durchflusszytometer gemessen werden ([Mazumder et al., 2008, Promega, 2013](#)).

Zur Durchführung dieses Versuches wurden die oben genannten Zelllinien verwendet.

Für die FITC-Aktiv-Caspase-3-Färbung wurden pro Zelllinie 8 Zellkulturflaschen à 25 cm² (Corning Flash with Cap 25cm²) vorbereitet:

- o Kontrolle
- o 10 Gy
- o 70 µg/l Selen
- o 140 µg/l Selen
- o 400 µg/l Selen
- o 10 Gy und 70 µg/l Selen
- o 10 Gy und 140 µg/l Selen
- o 10 Gy und 400 µg/l Selen

Die ersten Schritte der FITC-Aktiv-Caspase-3-Färbung entsprachen der Annexin-PI-Färbung. Zur Bestimmung der Apoptosefähigkeit der Zellen unter Seleneinfluss und nach Bestrahlung, wurden diese in 5 ml Medium in Zellkulturflaschen à 25 cm², nach tumorzellinienspezifischer Ausgangskonzentration, angesetzt. Im Anschluss an diesen Vorgang, wurde Selenase 100 µg pro Injektion (Natriumselenit-Pentahydrat 100 µg Selen in 2 ml Injektionslösung, biosyn Arzneimittel GmbH, Fellbach), in entsprechender Konzentration und in die dafür vorgesehenen Zellkulturflaschen hinzugegeben und für 24 Stunden bei 37° C inkubiert.

Nach 24 stündiger Inkubation unter Seleneinfluss, wurden die zu bestrahlenden Zellen bei 10 Gy mit 200 kv Röntgenstrahlung behandelt (Gulmay Bestrahlungsanlage RS225A, ; 500 mm Abstand, 200 kV, 15 mA, Filter 5) und danach erneut für 72 Stunden bei 37° C inkubiert.

Für die FITC-Aktiv-Caspase-3-Färbung wurde nach 72 Stunden zunächst das Medium jeder Zellkulturflasche à 25 cm² abgenommen. Dann wurde der Zellrasen mit DPBS gewaschen und zum Ablösen der Zellen 0,5 ml Trypsin-EDTA Lösung pro Flasche zugegeben. Danach wurden die Zellen, in Abhängigkeit von der Zelllinie unterschiedlich lange inkubiert.

Nach der Inkubation und Resuspension der gelösten Zellen wurde je Flasche 2 ml Medium hinzupipettiert.

Die Zellsuspension, jeder einzelnen Zellkulturflasche, wurde in jeweils ein 15 ml Polystyrene Round-Bottom Tube umgefüllt und bei 1500 rpm (rounds per minute) in der sogenannten Thermo Scientific Megafuge 1. OR für 3 min zentrifugiert.

Durch die Zentrifugation entstand ein Zellpellett, sowie ein zellfreier Überstand. Letzterer wurde verworfen und die Zellen anschließend mechanisch resuspendiert. Danach wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde abermals verworfen und die Zellen mechanisch resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen nochmals mit DPBS gewaschen. Vor der Zentrifugation wurden die Zellen ausgezählt.

Dazu wurden 10 µl Zellsuspension pro Tube entnommen und mit jeweils 10 µl Trypan Blue Solution in einer Ultra-Low-Cluster 96 well Platte vermischt. Nach der Vermengung, wurden die Zellen unter einem Axiovert 25 Mikroskop (Zeiss, Deutschland) ausgezählt.

Pro Tube sollten 10⁶ Zellen enthalten sein. Dies konnte mit folgender Formel errechnet werden:

$$Z = \frac{a}{q} \times 2 \times 10000 \times M$$
$$1000000 / Z$$

- o Z = Zellzahl insgesamt
- o a = Summe der in den Zählquadranten gezählten Zellen
- o q = Anzahl ausgezählter Zählquadranten
- o M = Menge des Mediums (in der die Zellen aufgenommen wurden)
- o 2 = Faktor zur 1:1 Verdünnung mit Trypanblau
- o 10000 = vordefiniertes Volumen der Zählkammer
- o 1000000 = Anzahl der auszusäenden Zellen

Die errechnete Zellmenge jeder Zellkulturflasche wurde in je ein neues 15 ml Polystyrene Round-Bottom Tube pipettiert und zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde verworfen und die Zellen mechanisch resuspendiert.

Zur Permeabilisierung der Zellen wurden 0,5 ml/Tube BD Cytotfix/Cytoperm™ zugegeben und die Zellen anschließend für exakt 20 min auf Eis inkubiert. Nach Einhaltung der Inkubationszeit fand eine erneute Zentrifugation, Verwerfung des Überstandes und Resuspension der Zellen statt.

Anschließend wurden die Zellen zweimal mit jeweils 0,5 ml/Tube BD Perm/Wash™ Buffer-Lösung (1:10 → 9 ml steriles Wasser und 1 ml BD Perm/Wash™ Buffer) gewaschen und zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde verworfen und die Zellen mechanisch resuspendiert.

Um die Caspase 3 im Durchflusszytometer (FacsCalibur) sichtbar zu machen, wurde jedes Tube mit 120 µl einer Antikörper-Puffer-Lösung (100 µl BD Perm/Wash™ Buffer und 20 µl BD Pharmingen™ -FITC Rabbit-Anti-Active-Caspase-3) aufgefüllt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Antikörper konnte in dieser Zeit an die Caspase 3 binden.

Im Anschluss wurde eine erneute Zentrifugation, Verwerfung des Überstandes und Resuspension der Zellen durchgeführt.

Dann wurde jeweils 1 ml/Tube BD Perm/Wash™ Buffer-Lösung hinzu gegeben und ein weiterer Zentrifugationsvorgang konnte durchgeführt werden.

Im letzten Schritt wurde 0,5 ml/Tube BD Perm/Wash™ Buffer-Lösung hinzu pipettiert und die Zellsuspension der Tubes in 5 ml Polystyrene Round-Bottom-Tubes umgefüllt.

Abschließend wurden die Zellen am FacsCalibur (FACS) durchflusszytometrisch gemessen und mittels der Cell-Quest-Pro-Software analysiert.

2.5 Messung der Anzahl von DNS-Doppelstrangbrüchen

Mittels der sogenannten γ H2AX-Methode ist der immunfluoreszenzmikroskopische Nachweis von DNS Doppelstrangbrüchen möglich. Diese Arbeit untersuchte die Induktion und Reparatur von DNS Doppelstrangbrüchen 24 Stunden nach Bestrahlung, im Zusammenhang mit verschiedenen Selenkonzentrationen.

Durch den Einfluss ionisierender Strahlung können Einzelstrangbrüche, Basenschäden und Doppelstrangbrüche in der DNS auftreten. Als Reaktion auf dieses Ereignis wird das Histon H2A am Serin 139 phosphoryliert (Rogakou et al., 1998). Durch die Zugabe eines primären Antikörpers, welcher gegen das Histon H2A (nun γ H2AX genannt) gerichtet ist und einem weiteren, mit Fluorochrom gekoppelten sekundären Antikörper, welcher an den ersten Antikörper bindet, können die Doppelstrangbrüche unter dem Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden. Das Auftreten und Verschwinden der Doppelstrangbrüche korreliert mit dem Reparaturvermögen der Zelle (Rothkamm and Lobrich, 2003).

Für diesen Versuch wurden die bereits oben genannten Brustzelllinien verwendet.

Zur Vorbereitung des γ H2AX-Tests wurden Objektträger mit Kammern (Lab Tek Camber Slide w/Cover) verwendet und jede Kammer mit 100 μ l BD Cell Tack™ Tissue Adhesive-PBS-Mischung (1:1000) bedeckt und für 20 min bei 37° C inkubiert. Dieser Schritt diente der besseren Anhaftung der Zellen.

Anschließend wurde jede Kammer mit 2,5 ml Medium aufgefüllt und die Zellen, nach tumorzelllinienspezifischer Ausgangskonzentration (MCF7 1:6, T47D 1:4, MDA-MB 231 1:10), angesetzt.

Für jede Zelllinie wurden folgende Objektträger vorbereitet:

- o Kontrolle
- o 4Gy
- o 70 μ g/l Selen
- o 140 μ g/l Selen
- o 400 μ g/l Selen
- o 4Gy und 70 μ g/l Selen
- o 4Gy und 140 μ g/l Selen
- o 4Gy und 400 μ g/l Selen

Selenase 100 μ g pro injectione (Natriumselenit-Pentahydrat 100 μ g Selen in 2 ml Injektionslösung, biosyn Arzneimittel GmbH, Fellbach) wurde in entsprechender Konzentration und in die dafür vorgesehenen Kammern hinzupipettiert und für 24 Stunden bei 37° C inkubiert.

Nach Ablauf der 24 Stunden wurden die zu bestrahlenden Zellen bei 4 Gy mit 200 kv Röntgenstrahlung behandelt (Gulmay Bestrahlungsanlage RS225A, 500 mm Abstand, 200 kV, 15 mA, Filter 5) und danach erneut für 24 Stunden bei 37° C inkubiert.

Anschließend, wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit DPBS gewaschen. Dann wurden die Zellen für 15 min bei Raumtemperatur mit 2 % PFA fixiert (2 % PFA: 1 g Paraformaldehyd in 50 ml DPBS).

Im Anschluss an die Fixierung wurde einmal mit DPBS und dreimal für jeweils 5 min mit 0,15 % Triton (100 ml DPBS und 150 μ l Triton X-100) gewaschen.

Triton X-100 wird zur Permeabilisierung der Membran benötigt, welche eine Anfärbung der inneren Zellstrukturen ermöglicht. Hierbei handelt es sich um ein nichtionisches Detergenz, welches nicht denaturierend wirkt (Aldrich, 2013).

Nachfolgend wurde dreimal für 10 min mit 3 ml PBS+ inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern (PBS+: 1 g BSA, 0,15 g Glycin, 100 ml DPBS).

Daraufhin wurde 75 µl einer Mischung, aus zwei verschiedenen primären Antikörpern, (Anti-phospho-Histone H2AX und pAb anti 53 BP1 Antibody) auf jeden Objektträger verteilt und über Nacht bei 4° C inkubiert. In der ersten Versuchsreihe wurden die Antikörper jeweils in einem Verhältnis von 1:350 verdünnt. Zur weiteren Optimierung wurde in der zweiten Versuchsreihe ein 1:700 Verhältnis des Anti-phospho-Histone H2AX und ein 1:250 Verhältnis des pAb anti 53 BP1 Antibody gewählt.

Nach nächtlicher Inkubation wurden die Zellen zunächst für 5 min mit 3 ml DPBS gewaschen und anschließend dreimal für 10 min mit 0,15 % Triton (100 ml DPBS und 150 µl Triton X-100) permeabilisiert. Es folgte ein erneutes 5 minütiges Waschen mit 3 ml PBS und eine Blockierung der Zellen mit 3 ml PBS+ (PBS+: 1g BSA, 0,15 g Glycin, 100 ml DPBS) für 7 min.

Nun wurden 75 µl einer Mischung aus zwei sekundären Antikörpern (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG 1:500 und Alexa Fluor 555 goat anti-mouse-IgG 1:500) auf jeden Objektträger verteilt und die Zellen eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde erneut zweimal für 10 min mit 3 ml 0,15 % Triton (100 ml DPBS und 150 µl Triton X-100) und einmal für 10 min mit DPBS gewaschen.

Das DPBS wurde vollständig abpipettiert und es wurden jeweils 8 µl Vectashield/DAPI pro Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas versiegelt.

Dieser Versuch wurde pro Zellreihe zweimal durchgeführt.

Die Auswertung fand mittels visueller Auszählung der Doppelstrangbrüche, unter dem Axiovert 25 Mikroskop, statt. Als Hilfe diente die Software Axio Vision Dokumentation der Carl Zeiss GmbH.

Insgesamt wurden pro Objektträger 100 Zellen ausgezählt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass nur einzelne Zellen gewählt werden und es zu keinen Überschneidungen mit anderen Zellen kommt.

Die Abbildungen 15 a- e zeigen die residualen Doppelstrangbrüche in den Zellen mit und ohne Behandlung nach einer Reparaturzeit von 24 Stunden. Die Färbung des Zellkerns fand mit DAPI statt.

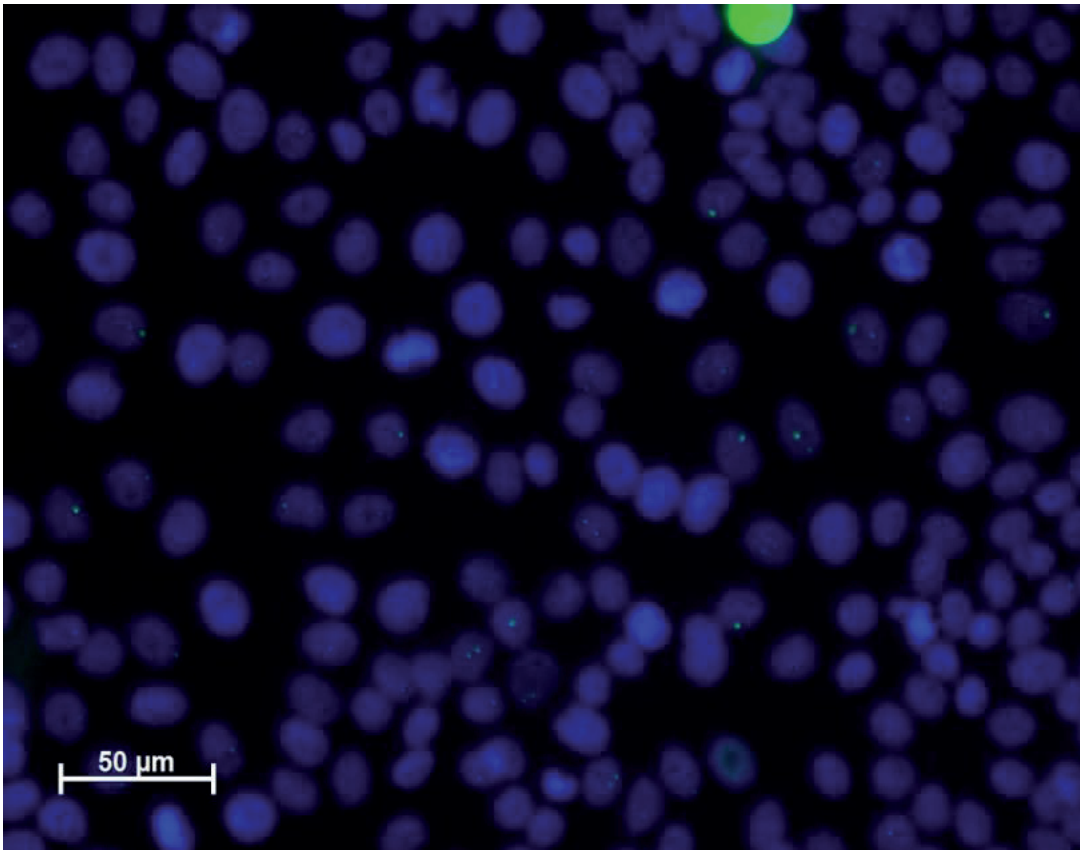


Abb.15a: γ -H2AX-Foci in MCF7-Zellkernen nach 24 h Reparaturzeit ohne Bestrahlung und Selen

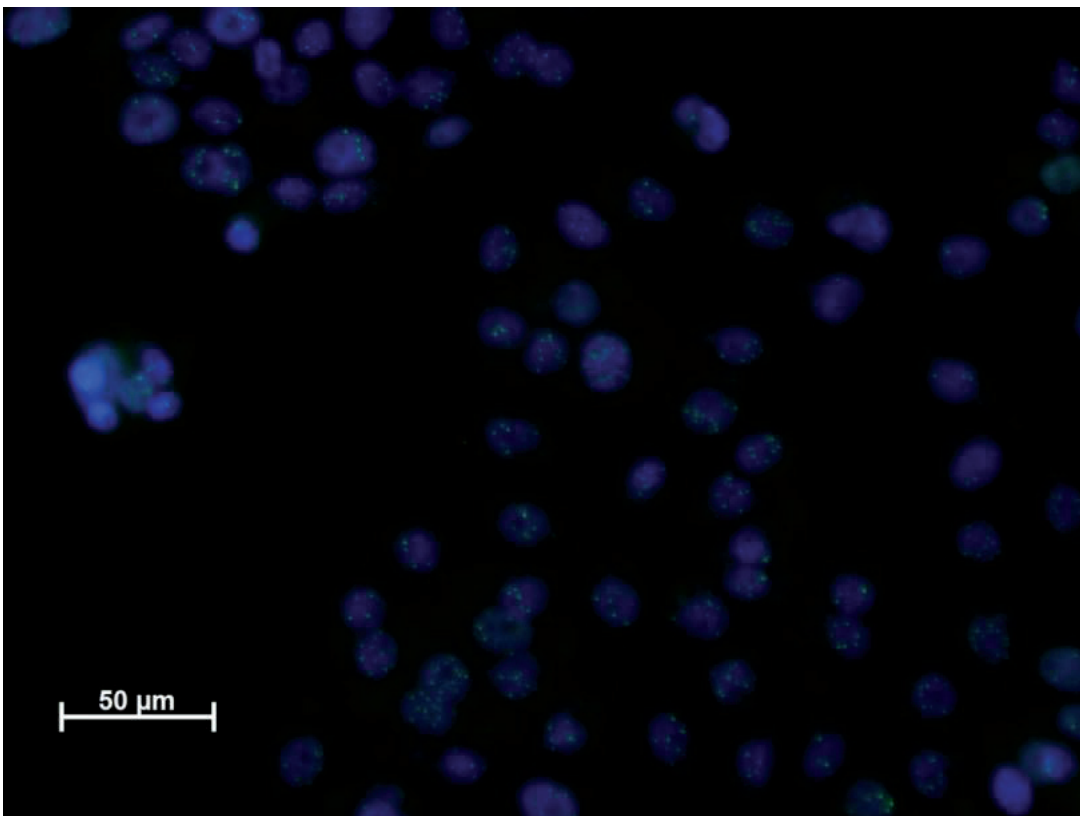


Abb.15b: γ -H2AX-Foci in MCF7-Zellkernen nach 4 Gy Bestrahlung und 24 h Reparaturzeit

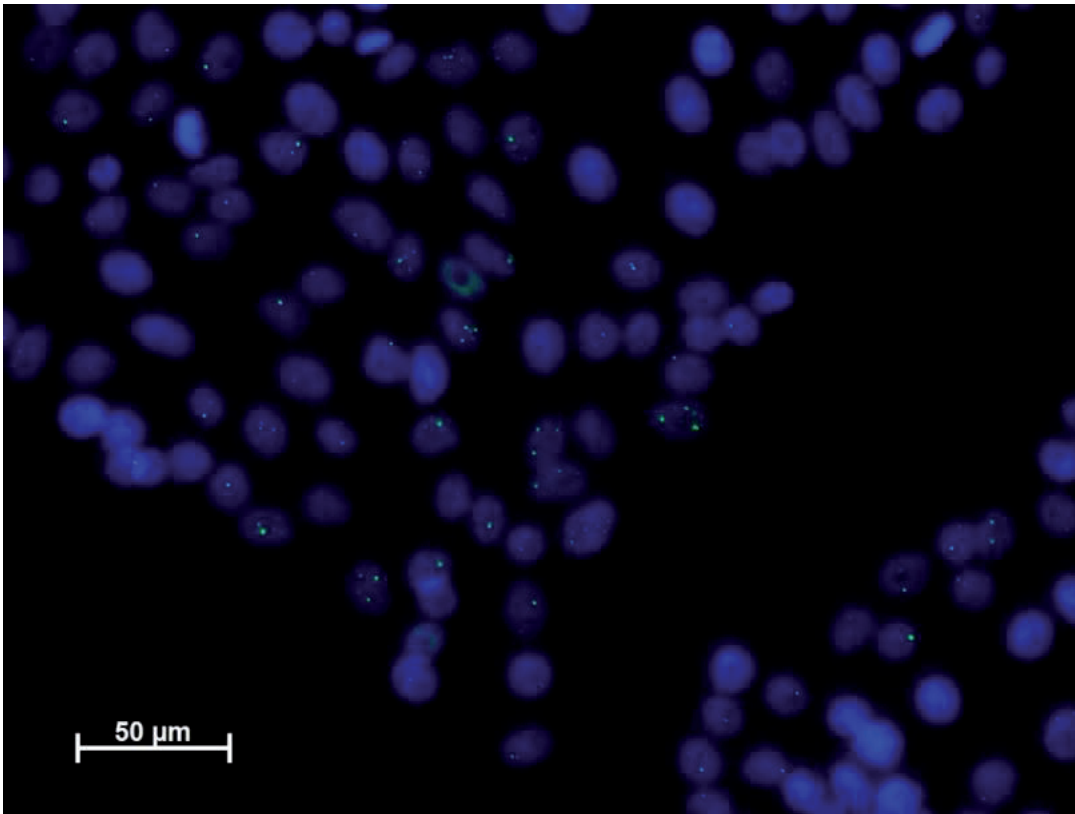


Abb.15c: γ -H2AX-Foci in MCF7-Zellkernen nach Behandlung mit 140 $\mu\text{g/l}$ Selen und 24 h Reparaturzeit

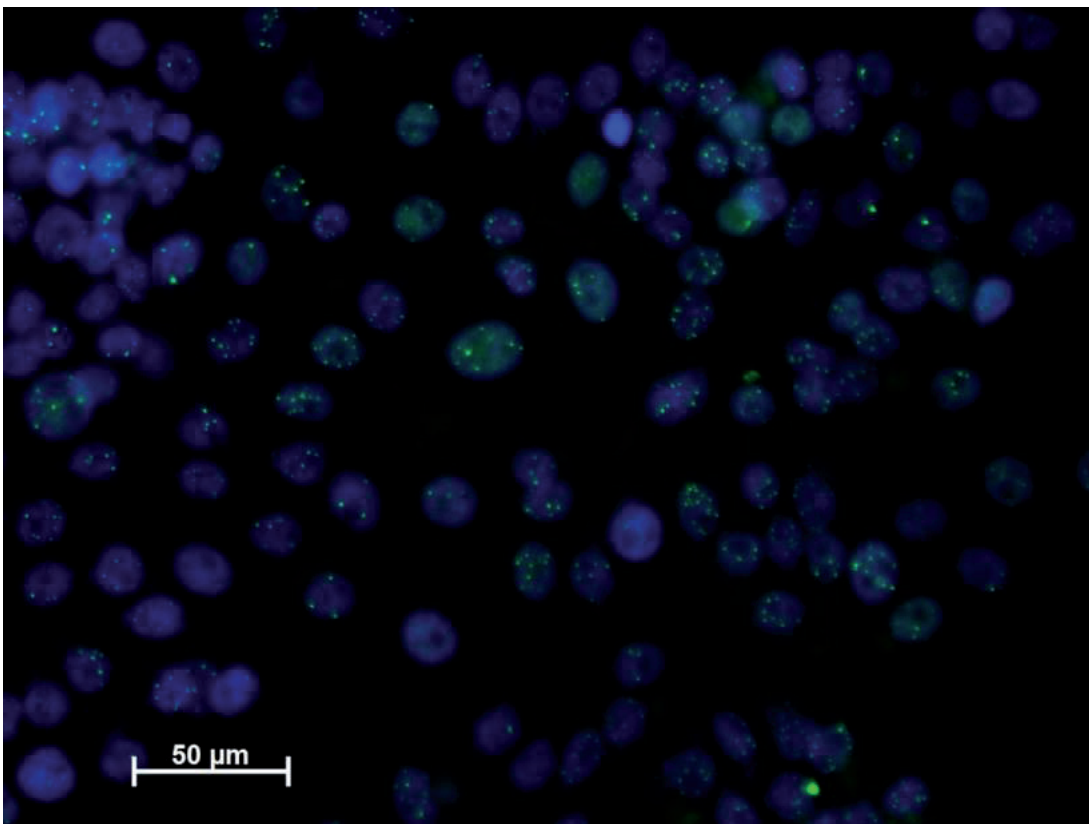


Abb.15d: γ -H2AX-Foci in MCF7-Zellkernen nach Behandlung mit 400 $\mu\text{g/l}$ Selen und 4 Gy Bestrahlung und 24 h Reparaturzeit

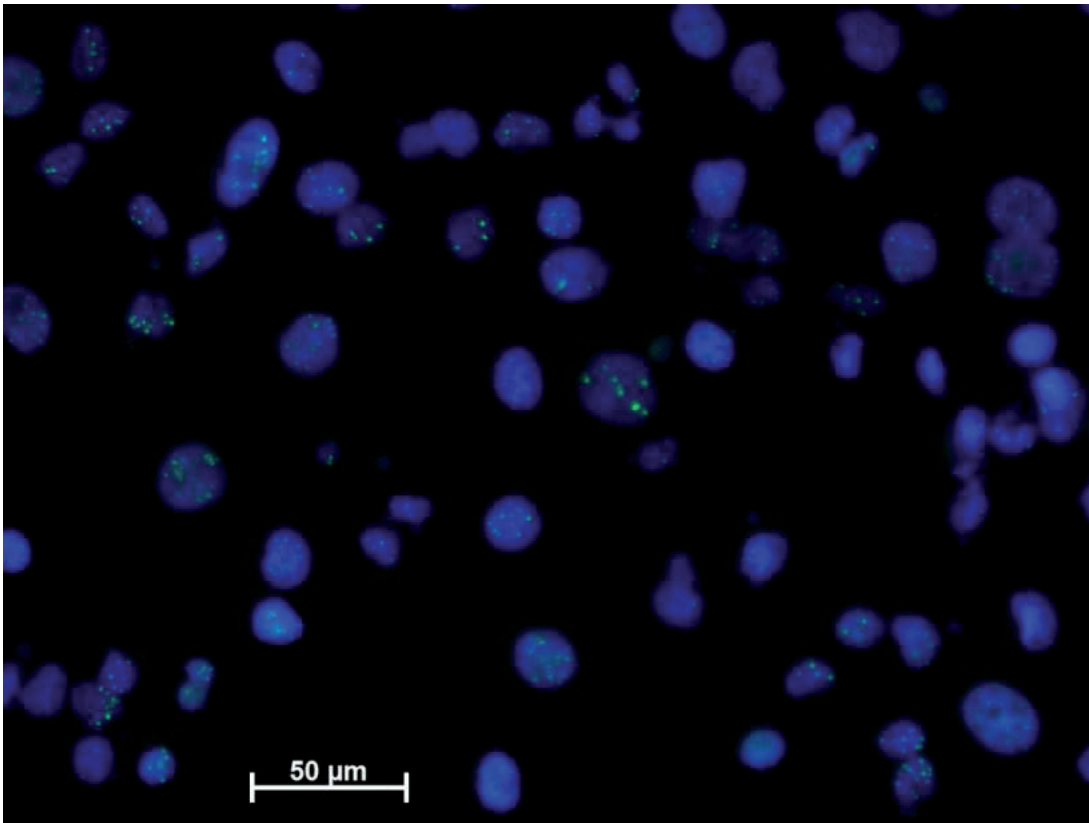


Abb.15e: γ -H2AX-Foci in MDA-MB 231 Zellkernen nach Behandlung mit 140 $\mu\text{g/l}$ Selen und 4 Gy Bestrahlung und 24 h Reparaturzeit

2.6 Messung des klonogenen Zellüberlebens

Mit Hilfe des Koloniebildungstest wird bestimmt, ob eine einzelne Zelle die Fähigkeit besitzt, sich mindestens achtmal zu teilen und dadurch eine Kolonie zu bilden.

Für diesen Versuch wurden die oben genannten Brustzelllinien verwendet.

Verwendet wurden pro Zelllinie 20 Clear Multiple Well Plates á 12 Well, welche nach folgendem Schema eingeteilt wurden:

- o 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy
- o 70 $\mu\text{g/l}$ Selen und 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy
- o 140 $\mu\text{g/l}$ Selen und 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy
- o 400 $\mu\text{g/l}$ Selen und 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy

2500 Zellen/ml sollten als Aussaatgrundlage dienen. Die Zelllinie T47D wurde mit einer Verdünnungsreihe von 125-250-500 Zellen/ml ausgesät. Die Brustzelllinien MCF7 und MDA-MB231 wurden für 0 Gy und 2 Gy ebenfalls mit 125-250-500 Zellen/ml und für 4 Gy, 6 Gy und 8 Gy mit 500-1000-2000 Zellen/ml angesetzt. In jedes Well wurden 2 ml der verdünnten Zell-Medium-Mischung eingebracht. Anschließend wurden die entsprechenden Selenkonzentrationen hinzu pipettiert und die Zellen für 24 Stunden bei 37° C inkubiert.

Nach 24 stündiger Inkubation unter Seleneinfluss, wurden die zu bestrahlenden Zellen bei 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy und 8 Gy mit 200 kv Röntgenstrahlung behandelt (Gulmay Bestrahlungsanlage RS225A, 500 mm Abstand, 200 kV, 15 mA, 0,5 mm Kupfer).

Es wurde abgewartet, bis sich Kolonien mit mindestens 50 Zellen (entspricht acht Zellteilungen) gebildet hatten, bevor die Zellen fixiert und analysiert wurden.

Dafür wurde zunächst das Zellmedium verworfen und die Zellen einmal mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde mit -20° C kaltem Methanol für 5 min fixiert. Nach Entfernung des Methanols wurden die Zellen für 1 min mit 0,1 % Crystal Violet Lösung angefärbt und die Platten mit Wasser nachgespült und getrocknet.

Nach der Trocknung wurde jeweils ein Well pro Platte unter dem Mikroskop ausgewertet um einen Richtwert für die Bioreader DE- Software zu erlangen, um anschließend mit deren Hilfe, eine Auswertung für die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen erstellen zu können.

Im Folgenden konnte nun die Plattierungseffizienz (PE) und die Überlebensfraktion (SF) errechnet werden:

$$\circ \text{ PE} = \frac{\text{Kolonieanzahl}}{\text{Ausgesäte Zellzahl}} \times 100\%$$

$$\circ \text{ SF} = \frac{\text{PE der bestrahlten Probe}}{\text{PE der Kontrolle}}$$

Die Darstellung der Überlebenskurven des klonogenen Zellüberlebens wurde anhand des linear-quadratischen Modells erstellt. Dafür verwendet wurden die Mittelwerte aus SF (SF=number of colonies formed after treatment/ number of cells seeded x PE, PE= number of colonies formed / number of cells seeded *100) und die daraus resultierenden Standardabweichungen.

In den Diagrammen erkennt man das relative Überleben der Zellen nach Bestrahlung und trägt diese logarithmisch gegen die Bestrahlungsdosis auf, wodurch die sogenannte Dosis-Effekt-Kurve entsteht. Für die mathematische Beschreibung der Kurvenverläufe und der individuellen Strahlensensibilität wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{S(D)}{S(0)} = \exp(\alpha D + \beta D^2) \quad \text{8-11 (Franken et al., 2006)}$$

- o $S(D)$ = Überleben nach Bestrahlung
- o $S(0)$ = Überleben ohne Bestrahlung
- o \exp = Exponentialfunktion
- o α = linearer Parameter
- o β = quadratischer Parameter
- o D = Bestrahlungsdosis
- o D^2 = Dosis x Dosis

Der Schnittpunkt mit der y-Achse (100 %) entspricht dem Überleben der unbestrahlten Kontrolle (Franken et al., 2006).

Das Verhältnis aus linearem und quadratischem Parameter bestimmt die Form der Überlebenskurve. Ist der Quotient aus α/β hoch, so entsteht ein linearer Graph, der für ein geringes Reparaturvermögen der Zellen spricht. Findet sich ein niedriger α/β Quotient, verläuft der Graph quadratisch und spricht für ein gutes Reparaturvermögen der Zellen (Williams et al., 1985).

SF 2 Gy ist ein Standardparameter, welcher angibt, wie groß der Anteil an Zellen ist, der nach einer Bestrahlung mit 2 Gy noch die Fähigkeit zur Koloniebildung besitzt.

Die Radiation enhancement ratio beschreibt das Verhältnis der bestrahlten Zellen zueinander, mit und ohne Selen einfluss, welche die Fähigkeit zur Koloniebildung besitzen (SF2 Gy / SF2 Gy + Selen).

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung fand mit dem sogenannten R-Programm statt und ermittelt mit Hilfe eines T-Tests den p-Value Wert. Als stark signifikant gilt ein p-Value von $< 0,01$ (***) , als signifikant $< 0,05$ (**) und ein Trend ist $< 0,10$ (*). Die Fehlerbalken in den Abbildungen 16a bis 18b zeigen den Standardfehler.

In der Annexin-PI-Färbung, der FITC-Caspase-3-Färbung, sowie der Messung der DNS-Doppelstrangbrüche wurde als Nullhypothese (H1) $\mu_0 = \mu_1$ und als Alternativhypothese (H1) $\mu_0 < \mu_1$ gewählt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit der entsprechenden Standardabweichung angegeben. Der T-Test wurde verwendet, um Unterschiede in den Behandlungsformen der Zelllinien, bezüglich ihrer Signifikanz, zu bewerten.

Es wurden alle drei Zelllinien einzeln betrachtet und ausgewertet. Bei der Annexin-PI-Färbung, der FITC-Caspase-3-Färbung, sowie der Messung der DNS-Doppelstrangbrüche wurde bei jeder Zelllinie zunächst die unbehandelte Probe (0 Selen_0 Gy) mit der bestrahlten Probe (0 Selen_10 Gy bzw. 0 Selen_4 Gy) verglichen. Anschließend wurde 0 Selen_0 Gy einem Vergleich mit Selen behandelten, nicht-bestrahlten Proben (70 Selen_0 Gy/140 Selen_0 Gy/400 Selen_0 Gy) unterzogen. 0 Selen_10 Gy bzw. 0 Selen_4 Gy wurde daraufhin verglichen mit Selen behandelten, bestrahlten Proben (70 Selen_10 Gy/ 140 Selen_10 Gy/ 400 Selen_10 Gy bzw. 70 Selen_4 Gy/ 140 Selen_4 Gy/ 400 Selen_4 Gy). Der letzte Schritt bestand daraus, die Selenkonzentrationen der nicht-bestrahlten Proben und die Selenkonzentrationen der bestrahlten Proben untereinander zu vergleichen.

Zur Ermittlung der signifikanten Daten des klonogenen Zellüberlebens (siehe Tab.10), wurde der Welch Two Sample t-test verwendet. Hierbei wurde die bestrahlte selenunbehandelte Probe (0 Selen_0 Gy/0 Selen_2 Gy/ 0 Selen_4 Gy/0 Selen_6 Gy/0 Selen_8 Gy) verglichen, mit den dazugehörigen bestrahlten und Selen behandelten Proben (z. B. 0 Gy_0 Selen wird ins Verhältnis gesetzt zu 70 Selen_0 Gy/140 Selen_0 Gy/400 Selen_0 Gy).

Mit Hilfe des linear quadratischen Modells konnte der α/β -Quotient ermittelt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Selen und Bestrahlung auf die Apoptosehäufigkeit von Mammakarzinomzellen mittels Annexin-PI-Färbung

Im ersten Teil werden nun die Ergebnisse der Annexin-PI-Färbung betrachtet. Hierbei wurde die Apoptosehäufigkeit der Zellen ausgewertet. Außerdem wurde Varianz und Standardabweichung mit einbezogen.

Die Abbildungen 16 a-c zeigen die Durchschnittswerte der einzelnen Zelllinien

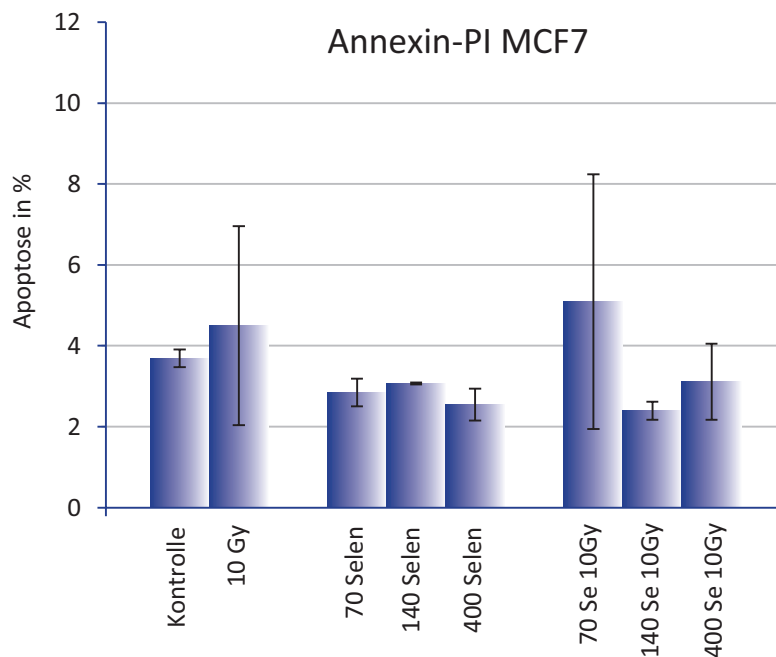


Abb. 16a: Durchschnittliche Apoptosehäufigkeit der Zelllinie MCF7 in % mittels Annexin-PI-Färbung

Auf der Y-Achse wird der Anteil der apoptotischen Ereignisse in Prozent dargestellt [Gated Events %] und auf der X-Achse ist die Behandlung der Zellen ersichtlich.

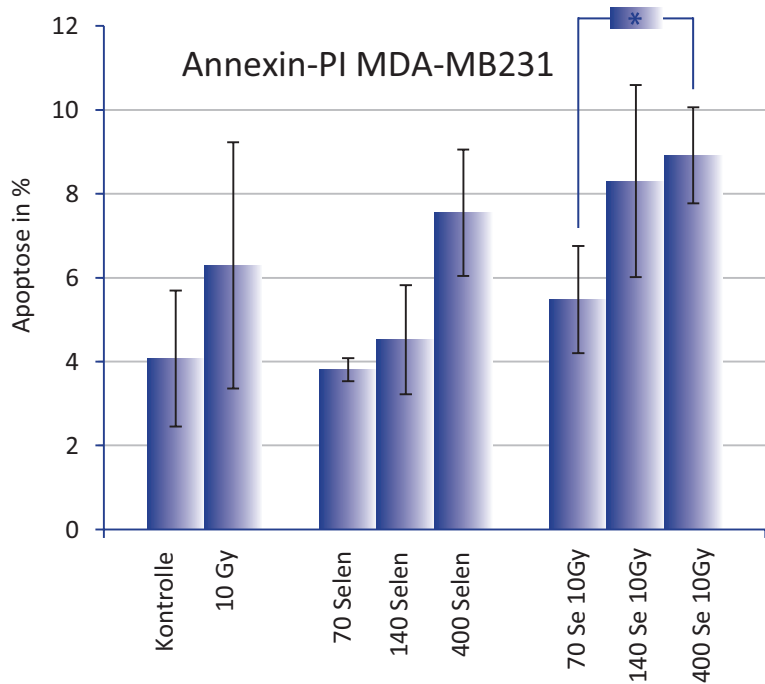


Abb. 16b: Durchschnittliche Apoptosehäufigkeit der Zelllinie MDA-MB 231 in % mittels Annexin-PI-Färbung

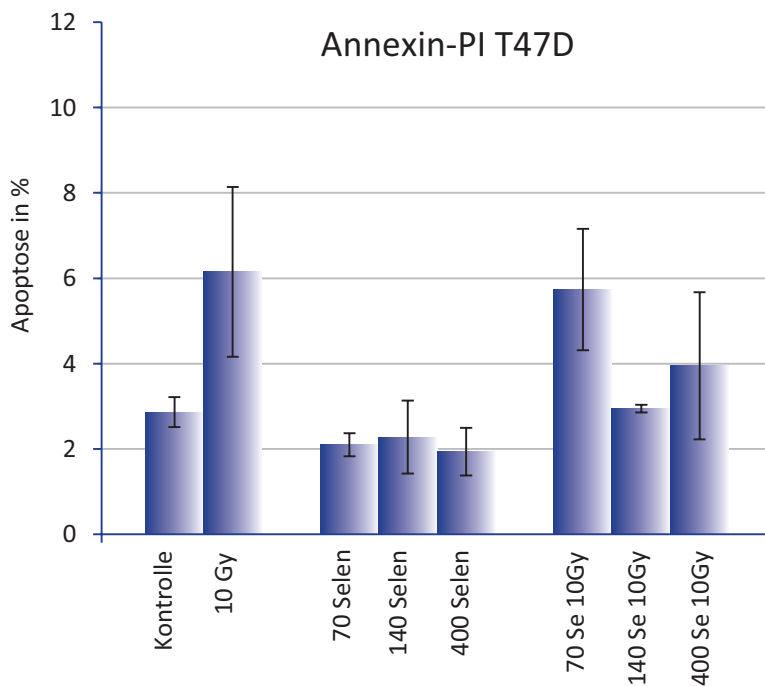


Abb. 16c: Durchschnittliche Apoptosehäufigkeit der Zelllinie T47D in % mittels Annexin-PI-Färbung

Die Tabelle 1 zeigt das Signifikanzniveau (p-Werte) der Apoptosehäufigkeit mittels Annexin-PI-Färbung

		MCF7	MDA-MB 231	T47D
0 Selen_0 Gy	0 Selen_10 Gy	0,40	0,30	0,17
0 Selen_0 Gy	70 Selen_0 Gy	0,90	0,55	0,88
	140 Selen_0 Gy	0,89	0,42	0,69
	400 Selen_0 Gy	0,92	0,13	0,84

0 Selen_10 Gy	0 Selen_10 Gy	0,45	0,58	0,56
	140 Selen_10 Gy	0,73	0,32	0,82
	400 Selen_10 Gy	0,66	0,27	0,75
70 Selen_0 Gy	140 Selen_0 Gy	0,31	0,34	0,44
70 Selen_0 Gy	400 Selen_0 Gy	0,69	0,12	0,59
140 Selen_0 Gy	400 Selen_0 Gy	0,79	0,14	0,61
70 Selen_10 Gy	140 Selen_10 Gy	0,73	0,21	0,85
70 Selen_10 Gy	400 Selen_10 Gy	0,68	0,09*	0,74
140 Selen_10 Gy	400 Selen_10 Gy	0,29	0,42	0,33

Tab.1: Signifikanzniveau der Apoptosehäufigkeit mittels Annexin-PI-Färbung, mit Hilfe des Welch Two Sample t-test. Stark signifikant ist p-Value < 0,01 (***), signifikant ist p-Value < 0,05 (**), ein Trend ist ein p-Value < 0,10 (*).

Die Daten konnten keine statistische Signifikanz erreichen. Alleinig der Vergleich zwischen 70 Selen_10 Gy und 400 Selen_10 Gy zeigte in der Zelllinie MDA MB231 einen Trend (p= 0,09) zur erhöhten Apoptoserate.

3.2 Einfluss von Selen und Bestrahlung auf die Apoptosehäufigkeit von Mammakarzinomzellen mittels FITC aktiv Caspase 3 Färbung

Im zweiten Teil werden die Ergebnisse der FITC-Caspase-3-Färbung betrachtet. Auch hier wurde die Apoptosehäufigkeit der Karzinomzellen bewertet.

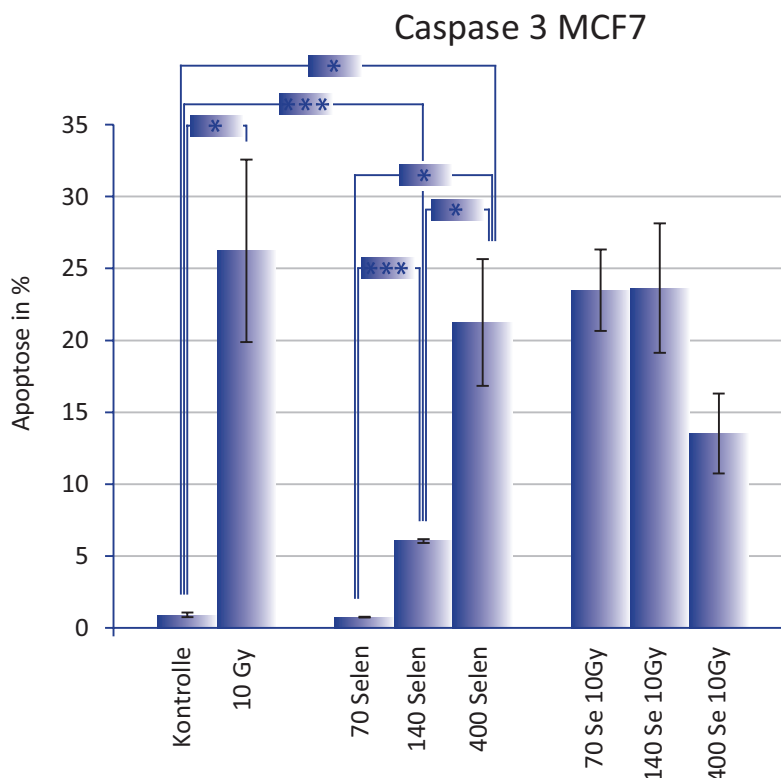


Abb. 17a: Durchschnittliche Apoptosehäufigkeit der Zelllinie MCF7 in % mittels FITC-aktiv- Caspase-3-Färbung

Zunächst wurde die Zellreihe MCF7 untersucht. Hier stieg die Apoptoserate nach alleiniger Bestrahlung mit 10 Gy ($p = 0,08$).

Wurden die Zellen mit 70 $\mu\text{g/l}$ Selen behandelt, so konnte keine signifikante Veränderung beobachtet werden. Dies änderte sich durch die Zugabe von höheren Selenkonzentrationen. Die Apoptose zeigte im Fall von 140 $\mu\text{g/l}$ Selen eine Signifikanz von $p = 0,0009$ und bei 400 $\mu\text{g/l}$ Selen einen Trend ($p = 0,07$).

Keine signifikanten Veränderungen fanden sich im Vergleich von selenbehandelten und bestrahlten Proben mit der unbehandelten Probe.

Wurden die Selen behandelten und nicht bestrahlten Proben miteinander verglichen, so konnte durch eine Erhöhung der Selenzugabe, eine verstärkte Apoptose bewirkt werden. Wurde anstatt 70 $\mu\text{g/l}$ Selen 140 $\mu\text{g/l}$ Selen zugegeben, konnte ein signifikant erhöhter Zelluntergang ($p = 0.01$) beobachtet werden. Standen die Zellen unter Behandlung von 400 $\mu\text{g/l}$ Selen, wurde im Vergleich zu den anderen Konzentrationen ein Trend zur verstärkten Apoptose sichtbar (70 Selen_0 Gy zu 140 Selen_0 Gy: $p = 0,07$, 140 Selen_0 Gy zu 400 Selen_0 Gy: $p = 0,09$).

Die bestrahlten Proben zeigten keine signifikante Änderung durch die Zugabe von Selen.

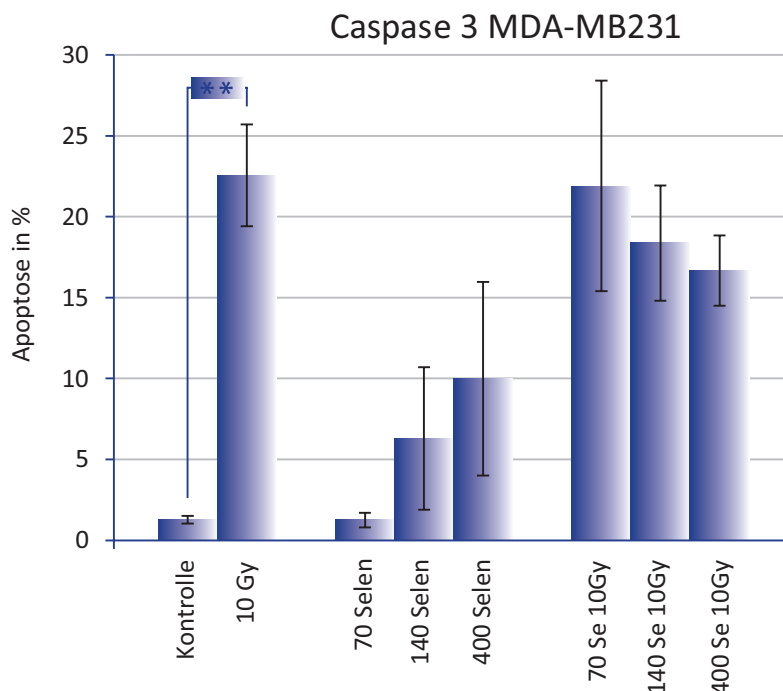


Abb. 17b: Durchschnittliche Apoptosehäufigkeit der Zelllinie MDA-MB 231 in % mittels FITC-aktiv-Caspase-3-Färbung

In der Abbildung 17c wird die Apoptosehäufigkeit der Zelllinie MDA-MB231 dargestellt. Hier konnte eine Erhöhung durch alleinige Bestrahlung erreicht werden ($p = 0,05$).

Die Zugabe von Selen bei nicht-bestrahlten, sowie bestrahlten Proben, ergab keine Signifikanzen.

Auch der Vergleich innerhalb der nicht-bestrahlten und mit Selen behandelten Zellen und der bestrahlten, selenhaltigen Proben führte zu keinem signifikanten Ergebnis.

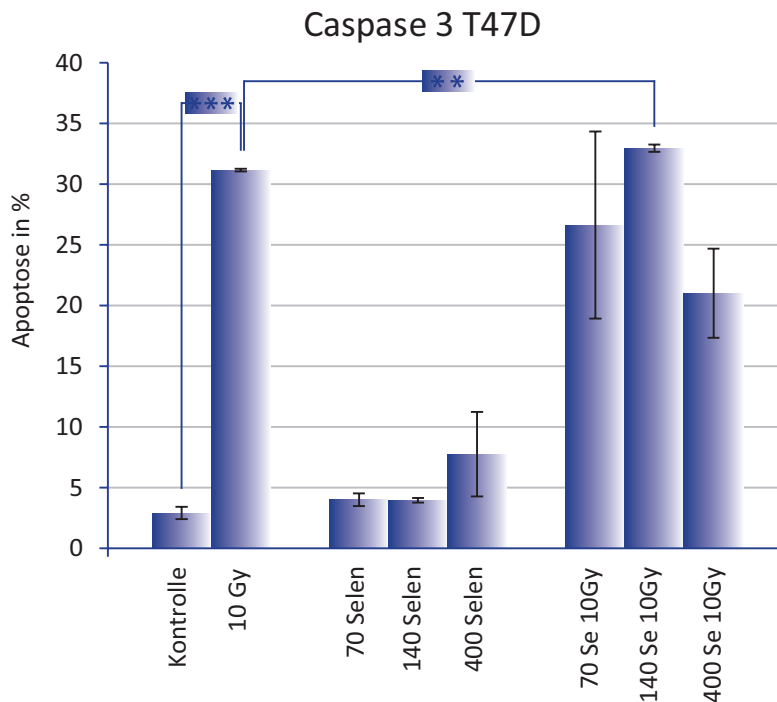


Abb. 17c: Durchschnittliche Apoptosehäufigkeit der Zelllinie T47D in % mittels FITC-aktiv-Caspase-3-Färbung

Bei der Betrachtung der Zellreihe T47D, wurde ein Bestrahlungseffekt deutlich ($p = 0,004$).

Im Gegensatz dazu, führte eine alleinige Behandlung mit Selen zu keinem signifikanten Ergebnis.

Lediglich die bestrahlten Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate durch die Zugabe von 140 $\mu\text{g/l}$ Selen ($p = 0,04$). Der Einsatz von 70 $\mu\text{g/l}$ Selen und 400 $\mu\text{g/l}$ Selen führte zu keiner statistischen Änderung.

Auch im Vergleich der Selenkonzentrationen miteinander, konnten keine Signifikanzen ermittelt werden. Weder bei den bestrahlten noch bei den unbestrahlten Proben entstand durch eine Erhöhung oder Erniedrigung von Selen ein Effekt.

		MCF7	MDA-MB 231	T47D	
0 Selen_0 Gy	0 Selen_10 Gy	0,08*	0,05**	0,00***	P-Value
0 Selen_0 Gy	70 Selen_0 Gy	0,75	0,51	0,14	P-Value
	140 Selen_0 Gy	0,01***	0,23	0,13	P-Value
	400 Selen_0 Gy	0,07*	0,19	0,20	P-Value
0 Selen_10 Gy	70 Selen_10 Gy	0,63	0,53	0,67	P-Value
	140 Selen_10 Gy	0,61	0,76	0,04**	P-Value
	400 Selen_10 Gy	0,87	0,86	0,89	P-Value
70 Selen_0 Gy	140 Selen_0 Gy	0,01***	0,23	0,52	P-Value
70 Selen_0 Gy	400 Selen_0 Gy	0,07*	0,19	0,24	P-Value
140 Selen_0 Gy	400 Selen_0 Gy	0,09*	0,34	0,24	P-Value
70 Selen_10 Gy	140 Selen_10 Gy	0,49	0,65	0,28	P-Value
70 Selen_10 Gy	400 Selen_10 Gy	0,93	0,72	0,70	P-Value
140 Selen_10 Gy	400 Selen_10 Gy	0,89	0,64	0,91	P-Value

Tab. 2: Signifikanzniveau der Apoptosehäufigkeit mittels FITC aktiv Caspase 3 Färbung, mit Hilfe des Welch Two Sample t-test. Stark signifikant ist p-Value < 0,01 (***), signifikant ist p-Value < 0,05 (**), ein Trend ist p-Value < 0,10 (*).

In dem Vergleich aller drei Zelllinien miteinander konnte ein signifikanter Unterschied in allen Zelllinien zwischen der unbehandelten und der bestrahlten Probe beobachtet werden. Die Zelllinie MCF7 zeigte einen Trend, die Zelllinien MDA-MD231 und T47D eine signifikante Änderung der Apoptose, was die erhöhte Rate bei alleiniger Bestrahlung bestätigt.

Die Zugabe von Selen in allen drei Konzentrationen, hatte keinen Effekt bei den Zelllinien MDA-MB231 und T47D. Die Zelllinie MCF7 hingegen reagierte mit einer verstärkten Apoptose bei der Zugabe von 140 µg/l und 400 µg/l Selen.

Wurden die Zellen bestrahlt und Selen zugegeben, konnte lediglich bei der Zelllinie T47D mit 140 µg/l Selen eine signifikante Erhöhung der Apoptose erreicht werden.

Im Vergleich der selenbehandelten, nicht-bestrahlten Proben miteinander, konnten Veränderungen in der Zelllinie MCF7 beobachtet werden. Hier wurde durch eine Erhöhung der Selenkonzentration ein Effekt erzielt. Dieser war durch die Zugabe von 140 µg/l Selen im Vergleich zu 70 µg/l Selen signifikant. Bei der Zugabe von 400 µg/l Selen konnte im Vergleich zu 140 µg/l und 70 µg/l Selen lediglich eine Tendenz zur verstärkten Apoptose erkannt werden.

In den anderen zwei Zelllinien erreichten die Daten keine Signifikanz.

Auch in der Betrachtung der bestrahlten und mit Selen behandelten Proben untereinander, konnte keine Veränderung beobachtet werden.

3.3 Einfluss von Selen und Bestrahlung auf die DNA-Doppelstrangbruchhäufigkeit von Mammakarzinomzellen

Um den Effekt von Selen auf die Entstehung und Reparatur von DNS Doppelstrangbrüchen in den Zellen, unter dem Einfluss mit und ohne Bestrahlung zu ermitteln, wurde die sogenannte γH2AX Methode angewandt. Es wurden die Zelllinien MCF7 und MDA-MB231 verwendet.

In den Abbildungen 18 a-b werden die Durchschnittswerte der einzelnen Zelllinien mit Varianz und Standardabweichung dargestellt.

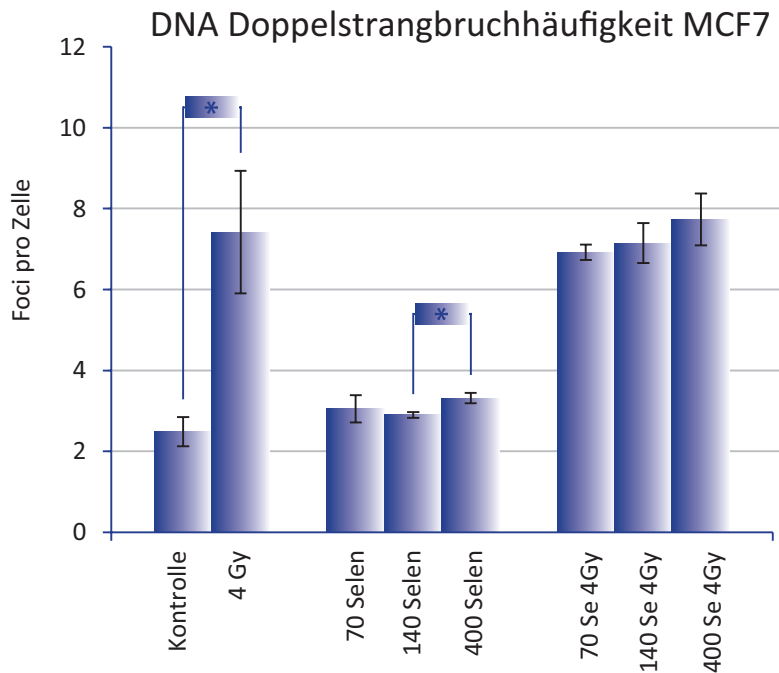


Abb. 18a: Durchschnittliche DNA- Doppelstrangbruchhäufigkeit der Zelllinie MCF7

Bei der Betrachtung der Zelllinie MCF7 konnte ein leichter Strahleneffekt anhand der gesteigerten Foci Häufigkeit erkannt werden ($p = 0,09$).

Die Zugabe von Selen bewirkte keinen Effekt in der Strangbruchhäufigkeit, weder mit, noch ohne Bestrahlung.

Wurden die nicht-bestrahlten und unter Seleneinfluss stehenden Zellen miteinander verglichen, konnte durch die Zugabe von 400 $\mu\text{g/l}$ Selen im Vergleich zu 140 $\mu\text{g/l}$ Selen eine geringe Erhöhung der Doppelstrangbruchhäufigkeit erzielt werden ($p = 0,07$).

Bei den bestrahlten, unter Seleneinfluss stehenden Zellen, erreichte die Datenlage dagegen keine Signifikanz.

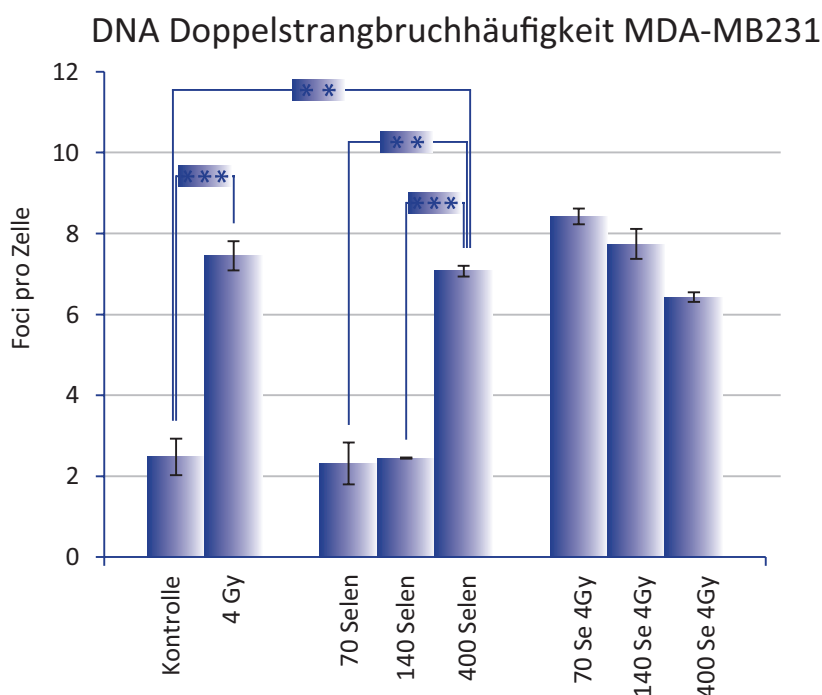


Abb. 18b: Durchschnittliche DNA- Doppelstrangbruchhäufigkeit der Zelllinie MDA-MB 231

In der Zelllinie MDA-MB231 konnte ebenfalls ein Bestrahlungseffekt mit 4 Gy erreicht werden. Die Foci-Häufigkeit stieg signifikant an ($p = 0,01$).

Wurden die Zellen mit Selen behandelt, kam es durch die Zugabe von 400 $\mu\text{g/l}$ Selen zu einer verstärkten Doppelstrangbruchhäufigkeit ($p = 0,02$). Bei der Zugabe von 70 $\mu\text{g/l}$ Selen und 140 $\mu\text{g/l}$ Selen entstanden dagegen keine Effekte.

Keine statistischen Unterschiede konnten beobachtet werden im Vergleich von bestrahlten und unter Seleneinfluss stehenden Zellen, mit der unbehandelten bestrahlten Probe.

Der Vergleich zwischen selenbehandelten, unbestrahlten Zellen miteinander, ergab eine vermehrte Foci-Häufigkeit bei der Zugabe von 400 $\mu\text{g/l}$ Selen. Diese war im Vergleich zu 70 $\mu\text{g/l}$ Selen signifikant ($p = 0,03$) und im Vergleich zu 140 $\mu\text{g/l}$ Selen schwach ausgebildet ($p = 0,01$).

Die Daten der bestrahlten und unter Seleneinfluss stehenden Zellen zeigten keine Unterschiede.

		MCF7	MDA-MB 231	
0 Selen_0 Gy	0 Selen_4 Gy	0,09*	0,01***	p-Value
0 Selen_0 Gy	70 Selen_0 Gy	0,19	0,58	p-Value
	140 Selen_0 Gy	0,23	0,52	p-Value
	400 Selen_0 Gy	0,12	0,02**	p-Value
0 Selen_4 Gy	70 Selen_4 Gy	0,60	0,20	p-Value
	140 Selen_4 Gy	0,22	0,32	p-Value
	400 Selen_4 Gy	0,44	0,91	p-Value
70 Selen_0 Gy	140 Selen_0 Gy	0,63	0,42	p-Value
70 Selen_0 Gy	400 Selen_0 Gy	0,29	0,03**	p-Value
140 Selen_0 Gy	400 Selen_0 Gy	0,07*	0,01***	p-Value
70 Selen_4 Gy	140 Selen_4 Gy	0,21	0,79	p-Value
70 Selen_4 Gy	400 Selen_4 Gy	0,21	0,81	p-Value
140 Selen_4 Gy	400 Selen_4 Gy	0,78	0,93	p-Value

Tab. 3: Signifikanzniveau der DNA- Doppelstrangbruchfähigkeit mittels γH2AX - Methode, mit Hilfe des Welch Two Sample t-test. Stark signifikant ist $p\text{-Value} < 0,01$ (***), signifikant ist $p\text{-Value} < 0,05$ (**), eine Tendenz ist $p\text{-Value} < 0,10$ (*).

Im Vergleich beider Zelllinien miteinander konnte in beiden Zelllinien ein Strahleneffekt, durch erhöhte Foci-Raten, gesehen werden. Dieser war bei MCF7 schwach ausgeprägt, bei MDA-MB231 stark signifikant. Die Zugabe von 400 $\mu\text{g/l}$ Selen ohne Bestrahlung zeigte lediglich Signifikanzen in der Zelllinie MDA-MB231, hier wurden mehr DNS-Doppelstrangbrüche erkennbar. Bei der Zelllinie MCF7 wurde keine Veränderung sichtbar. Auch die Zugabe von 70 $\mu\text{g/l}$ Selen und 140 $\mu\text{g/l}$ führte zu keinem Effekt.

Beide Zelllinien zeigten, dass eine Selenzugabe unter Bestrahlungseffekt, zu keinem vermehrten Auftreten von DNS- Doppelstrangbrüchen führt.

Im Vergleich der unterschiedlichen Selenkonzentrationen miteinander konnte lediglich eine Änderung der nicht bestrahlten Zellen als signifikant gewertet werden. Ein deutlicher Unterschied fand sich in der Zelllinie MDA-MB231 durch die Zugabe von 400 µg/l Selen im Vergleich zu 70 µg/l Selen ($p = 0,03$). In beiden Zelllinien konnte durch die Zugabe von 400 µg/l Selen im Vergleich zu 140 µg/l Selen eine signifikante Foci-Vermehrung beobachtet werden. Bei der Zelllinie MCF7 bestand eine Tendenz ($p = 0,07$) und bei der Zelllinie MDA-MB231 eine starke Signifikanz ($p = 0,01$) zur vermehrten DNS-Doppelstrangbruchhäufigkeit.

Die Datenlage der anderen Selenkonzentrationen zeigte keine signifikanten Änderungen.

3.4 Einfluss von Selen und Bestrahlung auf das klonogene Zellüberleben von Mammakarzinomzellen

In Abbildung 19 werden die Zelllinien in ihrem Verlauf gegenüber gestellt und beurteilt. Als strahlensensibel gelten hier die Zelllinien MCF7 und MDA-MB231, wobei MCF7 bei 6 Gy und 8 Gy eine leicht erhöhte Resistenz gegenüber MDA-MB231 aufweist. Als eher strahlenresistent gilt die Zelllinie T47D, welche gegenüber den anderen Zelllinien deutliche Unterschiede aufzeigt.

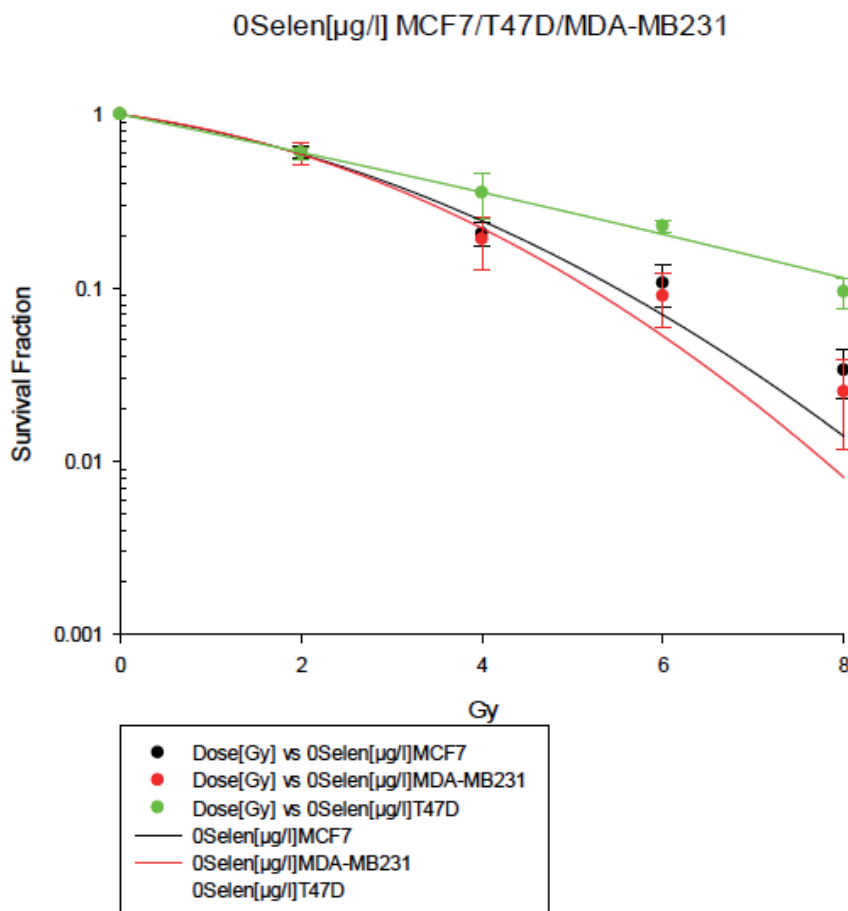


Abb.19: Zellüberleben der MCF7, MDA-MB231 und T47D nach Bestrahlung mit 0Gy, 2Gy, 4Gy, 6Gy und 8Gy

Im ersten Abschnitt wird die Zelllinie MCF7 betrachtet, welche in der Abbildung 20 dargestellt ist.

Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy oder 8 Gy bestrahlt und mit unterschiedlichen Selenkonzentrationen behandelt (70 µg/l Selen, 140 µg/l Selen, 400 µg/l Selen).

Bei der eher strahlensensiblen Zelllinie MCF7 konnte durch die alleinige Zugabe von 70 µg/l Selen, ohne Bestrahlung, bereits eine signifikante Änderung ($p = 0,05$) erzielt werden. Die Behandlung mit höheren Konzentrationen ergab dagegen keinen Effekt.

Durch eine Erhöhung der Strahlendosis, konnte lediglich bei 4 Gy durch die Zugabe von 70 µg/l Selen ($p = 0,07$) und 400 µg/l Selen ($p = 0,09$) eine schwach signifikante Änderung beobachtet werden. Bei den anderen Strahlendosen blieb die Wirkung jedoch aus.

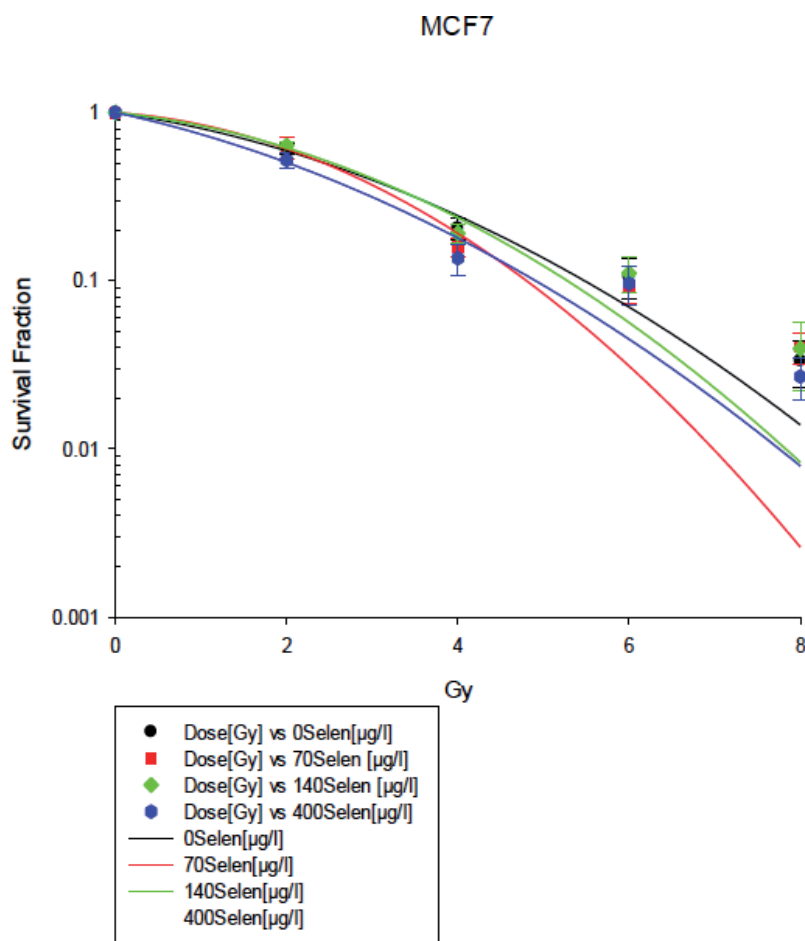


Abb.20: Strahlensensibilität der Zellreihe MCF7 mit verschiedenen Bestrahlungs- und Selenkonzentrationen

Zur Quantifizierung der Strahlenwirkung unter Einfluss von Selen wurden die gewebespezifischen Konstanten α und β mit Hilfe des linear quadratischen Modells aus der Überlebensfraktion im Dosisbereich von 0 Gy bis 8 Gy ermittelt.

Die unbehandelte Probe zeigte einen α/β - Quotienten von 3,81. Wurde 70 $\mu\text{g/l}$ Selen hinzugefügt, konnte ein Abfall des α/β - Quotienten auf 1,01 beobachtet werden. Ebenfalls zu einem Abfall kam es bei der Zugabe von 140 $\mu\text{g/l}$ Selen auf 2,05, wohingegen die Zugabe von 400 $\mu\text{g/l}$ Selen zu einem Anstieg des Quotienten auf 5,82 führte.

MCF7	α	Std. Error	β	Std. Error	$\alpha \div \beta$
0 $\mu\text{g/l}$ Selen	0,17	0,05	0,05	0,02	3,81
70 $\mu\text{g/l}$ Selen	0,08	0,09	0,08	0,03	1,01
140 $\mu\text{g/l}$ Selen	0,12	0,08	0,06	0,02	2,05
400 $\mu\text{g/l}$ Selen	0,25	0,09	0,04	0,03	5,82

Tab.4: α/β - Quotient für die Zelllinie MCF7

Zur abschließenden Beurteilung der Überlebensfraktion der Zelllinie MCF7 wurde noch die radiation enhancement ratio betrachtet. Diese bezieht sich speziell auf die Bestrahlung mit 2Gy.

Bei der Zugabe von Selen, konnte in jeder Konzentration ein Anstieg des Faktors beobachtet werden. Dieser betrug bei 70 $\mu\text{g/l}$ Selen und 400 $\mu\text{g/l}$ Selen 1,20 und bei 140 $\mu\text{g/l}$ Selen 1,07.

Radiatio enhancement ratio	
<u>MCF7</u>	
2 Gy / 2 Gy	1,00
2 Gy / 70 Selen_2Gy	1,20
2 Gy / 140 Selen_2 Gy	1,07
2 Gy / 400 Selen_2 Gy	1,20

Tab.5: Radiation enhancement ratio der Zelllinie MCF7

Die Zelllinie MDA-MB231 zeigte lediglich bei der Zugabe von 70 $\mu\text{g/l}$ Selen ohne Bestrahlung eine schwach signifikante Erhöhung der Überlebensfraktion ($p = 0.09$). Bei den anderen Bestrahlungsdosen konnte durch die Zugabe von Selen kein signifikanter Effekt erzielt werden.

MDA-MB231

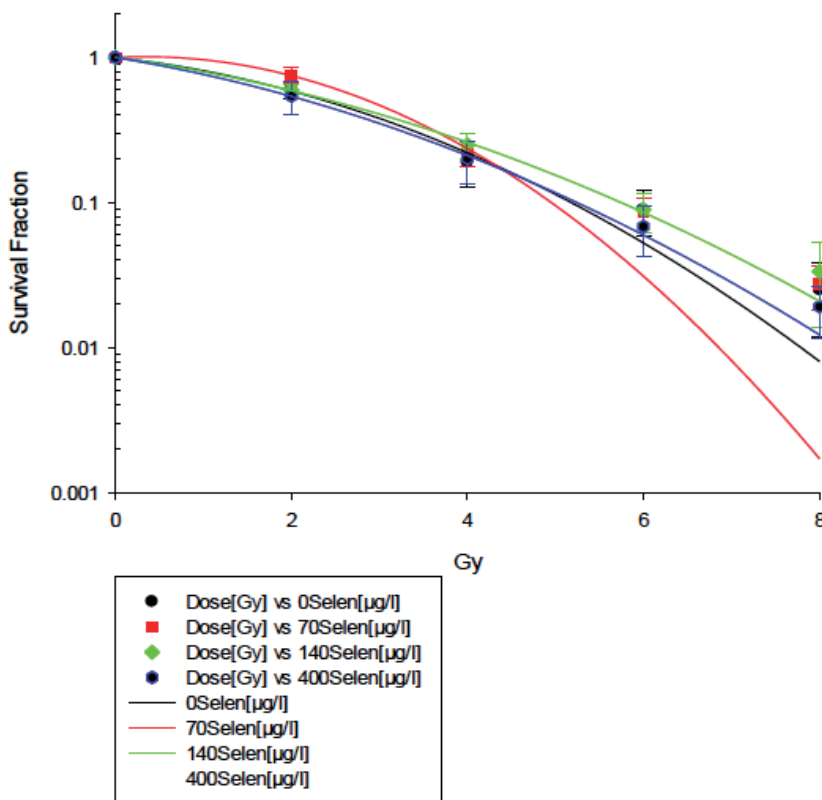


Abb.21: Strahlensensibilität der Zellreihe MDA-MB231 mit verschiedenen Bestrahlungs- und Selenkonzentrationen

Bei der Betrachtung des α/β - Quotienten konnte ein Abfall bei 70 $\mu\text{g/l}$ Selen auf 0,67 und ein Anstieg durch die Zugabe von 140 $\mu\text{g/l}$ Selen (5,15) und 400 $\mu\text{g/l}$ Selen (5,65) beobachtet werden.

MDA-MB231	α	Std. Error	β	Std. Error	$\alpha \div \beta$
0 $\mu\text{g/l}$ Selen	0,15	0,05	0,06	0,02	2,73
70 $\mu\text{g/l}$ Selen	- 0,07	0,06	0,11	0,02	- 0,67
140 $\mu\text{g/l}$ Selen	0,19	0,02	0,04	0,00	5,15
400 $\mu\text{g/l}$ Selen	0,23	0,02	0,04	0,00	5,65

Tab.6: α/β - Quotient für die Zelllinie MDA-MB231

Die Daten der Radiation enhancement ratio zeigten einen Anstieg des Faktors bei 70 $\mu\text{g/l}$ Selen (1,85) und 400 $\mu\text{g/l}$ Selen (1,10) und einen Abfall bei 140 $\mu\text{g/l}$ Selen auf den Faktor 0,94.

Radiatio enhancement ratio	
MDA-MB 231	
2 Gy / 2 Gy	1,00
2 Gy / 70 Selen_2 Gy	1,85
2 Gy / 140 Selen_2 Gy	0,94
2 Gy / 400 Selen_2 Gy	1,10

Tab.7: Radiation enhancement ratio der Zelllinie MDA-MB231

Die Datenlage der strahlenresistenteren Zelllinie T47D ergab keine signifikanten Ergebnisse.

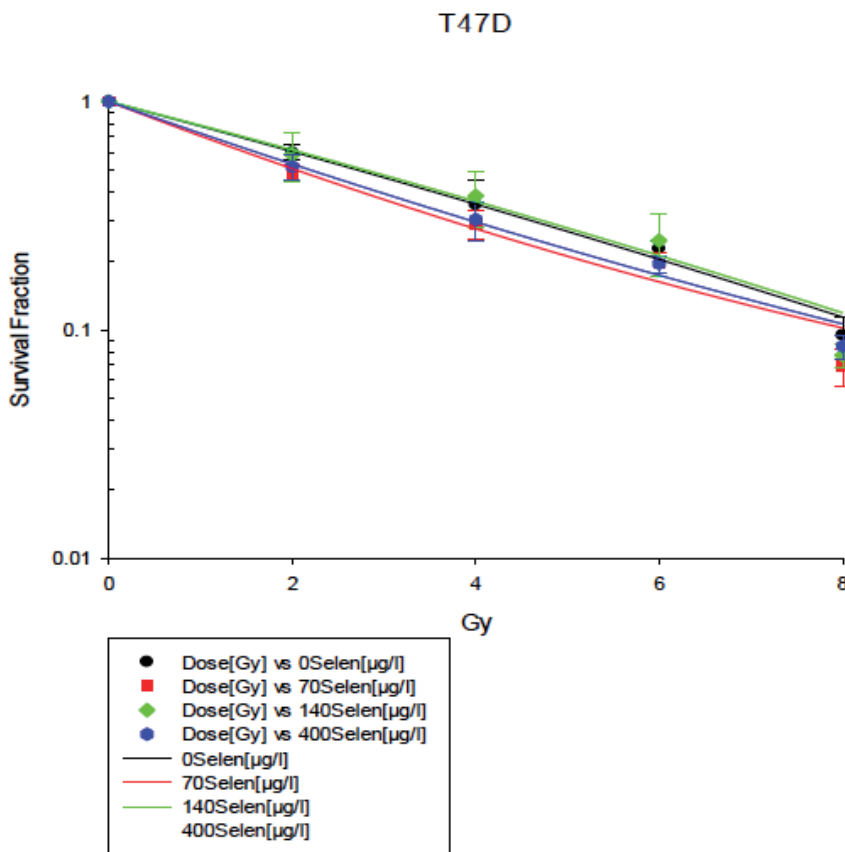


Abb.21: Strahlensensibilität der Zellreihe MDA-MB231 mit verschiedenen Bestrahlungs- und Selenkonzentrationen

Der α/β -Quotient sank bei der Zugabe der unterschiedlichen Selenkonzentrationen in allen drei Konzentrationen, wobei der Abfall bei 70 µg/l Selen am stärksten war (40,03). Bei 400 µg/l Selen betrug der Quotient 55,47 und bei 140 µg/l Selen 63,95.

T47D	α	Std. Error	β	Std. Error	α/β
0 µg/l Selen	0,25	0,02	0,00	0,00	74,45
70 µg/l Selen	0,36	0,04	- 0,01	0,01	- 40,03
140 µg/l Selen	0,24	0,04	0,00	0,01	63,95
400 µg/l Selen	0,33	0,02	- 0,01	0,00	- 55,47

Tab.8: α/β - Quotient für die Zelllinie T47D

Die radiation enhancement ratio fiel bei 70 µg/l Selen auf 0,99 und stieg bei höheren Konzentrationen an (140 µg/l Selen 1,19, 400 µg/l Selen 1,20).

Radiation enhancement ratio	
T47D	
2 Gy / 2 Gy	1,00
2 Gy / 70 Selen_2Gy	0,99
2 Gy / 140 Selen_2 Gy	1,19
2 Gy / 400 Selen_2 Gy	1,20

Tab.9: Radiation enhancement ratio der Zelllinie T47D

		T47D	MDA	MCF7
p-value				
0 Selen_0 Gy	70 Selen_0 Gy	0.9156	0.09066*	0.04537**
	140 Selen_0 Gy	0.433	0.9652	0.2159
	400 Selen_0 Gy	0.7698	0.273	0.2841
0 Selen_2 Gy	70 Selen_2 Gy	0.5411	0.2715	0.2974
	140 Selen_2 Gy	0.3542	0.6388	0.3428
	400 Selen_2 Gy	0.2713	0.4184	0.1249
0 Selen_4 Gy	70 Selen_4 Gy	0.5244	0.2072	0.07355*
	140 Selen_4 Gy	0.5341	0.7964	0.3068
	400 Selen_4 Gy	0.38	0.5779	0.08577*
0 Selen_6 Gy	70 Selen_6 Gy	0.6722	0.1424	0.2299
	140 Selen_6 Gy	0.5194	0.5454	0.492
	400 Selen_6 Gy	0.1993	0.3256	0.401
0 Selen_8 Gy	70 Selen_8 Gy	0.3891	0.2606	0.5299
	140 Selen_8 Gy	0.1948	0.6477	0.5756
	400 Selen_8 Gy	0.3635	0.3718	0.3188

Tab. 10: Signifikanzniveau der Überlebensfraktion mittels Koloniebildungstest, mit Hilfe des Welch Two Sample t-test. Stark signifikant ist p-Value < 0,01 (***), signifikant ist p-Value < 0,05 (**), eine Tendenz ist p-Value < 0,10 (*).

4 Diskussion

Die Literatur weist zahlreiche Arbeiten auf, die eine positive Wirkung von Selen während der Strahlentherapie auf Normalgewebe und Krebszellen beschreibt (Diamond et al., 1996, Rodemann et al., 1999, Schumacher, 2000, Schleicher et al., 1999). Auch im Zusammenhang mit Mammakarzinom zeigen bereits veröffentlichte Publikationen, dass Selen positive Auswirkungen auf gesundes Gewebe hat, da oxidativer Stress, der durch Bestrahlung verursacht wird, mittels der Zugabe von Selen, reduziert werden kann (Franca et al., 2011, Lopez-Saez et al., 2003, Kowalska et al., 2005).

Die antioxidative Wirkung von Selen kann aber auch einen negativen Einfluß während der Strahlentherapie haben, da Selen nicht nur das gesunde, sondern auch das tumoröse Gewebe vor Strahleneffekten schützen und dadurch das Abtöten von Tumorzellen verhindern könnte. Da dieser mögliche Effekt bisher noch nicht ausreichend wissenschaftlich untersucht wurde und entscheidende Erkenntnisse für die zukünftige Behandlungsstrategie liefern könnte, wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Bestrahlung von Tumorzellen in Abhängigkeit von der Selenkonzentration im Medium untersucht.

Es wurden drei verschiedene Brustkrebszelllinien ausgewählt und mittels *in-vitro* Versuchen drei verschiedene charakteristische Endpunkte untersucht: Die Apoptoserate, die DNS- Doppelstrangbruchhäufigkeit und das klonogene Zellüberleben. Desweiteren wurde die zentrale Rolle von Selen und deren Einfluss auf die Tumorzellprozesse und ihre mögliche prognostische und therapeutische Bedeutung diskutiert.

Der erste Endpunkt, die Apoptosehäufigkeit, also der programmierte physiologische Zelltod, wurde mittels zweier Methoden, der Annexin-PI-Färbung und der FITC Active Caspase 3 Färbung, analysiert. Diese beiden Apoptosemessmethoden unterscheiden sich im Zeitpunkt der Apoptose. Dabei beschreibt die Annexin-PI-Färbung den frühen und die FITC Active Caspase 3 Färbung den späten Zeitpunkt der Apoptose.

Die Messung der Apoptosehäufigkeit ist ein wichtiger Bestandteil in der Strahlentherapieforchung, um zum einen den Zelltod und zum anderen den Unterschied zwischen apoptotischem und nekrotischem Tumorzelluntergang unter ionisierender Strahlung zu quantifizieren. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Apoptosehäufigkeit unter ionisierender Strahlung unter Seleneinfluss untersucht.

In bereits publizierten Studien an unterschiedlichsten Tumorzellen konnte anhand der Apoptosehäufigkeit gezeigt werden, dass Selen ohne Bestrahlung eine verstärkende apoptotische Wirkung hat. Gezeigt wurde dies, unter anderem beim Prostatakarzinom, Kolonkarzinom, Lungenkarzinom, Leberkarzinom, Ovarialkarzinom und bei der Leukämie (Sanmartin et al., 2008, Zeng et al., 2010). Beim Kolonkarzinom beispielsweise, konnte die Proliferation der Karzinomzellen um 63% durch Selen vermindert und die Apoptoserate verdoppelt werden (Zeng et al., 2010). Hierbei spielte das p-53 eine entscheidende Rolle. Es ist ein Induktor des apoptotischen Vorgangs. Beim Prostatakarzinom konnte durch die gesteigerte Aktivität von p-53 mittels Selen, die Apoptose durch vermehrte Caspase 9 Aktivität gesteigert werden (Zhao et al., 2006). Darüber hinaus konnte auch beim Kolonkarzinom durch eine erhöhte Produktion von p-53 durch die Zugabe von Selen ein verstärkter Zellzyklusarrest und Apoptose erzielt werden (Goel et al., 2006).

Im Jahr 2013 konnten auch Huang et al. die Induktion der Apoptose durch erhöhtes p-53 in Tumoren nachweisen (Huang et al., 2013). Und auch andere Autoren konnten die gesteigerte Bildung von p-53 durch Selengabe in Prostatakarzinomzellen (Tsavachidou et al., 2009), sowie bei Zellen des Cervixkarzinoms (Wallenberg et al., 2014), feststellen.

Guan et al. (Liyang Guan et al., 2008) konnten mit ihrer Studie einen verstärkten antileulämischen Effekt durch die Aktivierung der Apoptose in NB4-Zellen durch Selen nachweisen und Jiang et al. beschrieben ebenfalls eine Zunahme der Apoptose durch Selenzusatz in Mamma- und Prostata-modellen (Jiang et al., 2009). Auch in der Behandlung des Kolonkarzinoms konnten positive Auswirkungen auf die Tumorzellen durch die Gabe von Selen beobachtet werden. Hier konnte eine um das Doppelte erhöhte Apoptoserate erreicht werden (Zeng et al., 2010).

Bei der Betrachtung der Apoptosehäufigkeit der drei Brustkrebszelllinien MCF7, MDA-MB231 und T47D in der vorliegenden Arbeit mittels Annexin-PI unter Bestrahlungs- und Seleneinfluss, zeigten sich keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Apoptoserate. Als zweiter Apoptosetest wurde der Caspase 3 Test gewählt, um in einem weiteren Test die spätere Apoptose zu bestimmen.

Der Annexin-PI-Test zeigte lediglich einen Trend (p-value 0,09) zur erhöhten Apoptose bei der Zelllinie MDA-MB231. Hier konnte im Vergleich zu den bestrahlten Zellen durch die Zugabe von 400µg/l Selen im Gegensatz zu 70µg/l Selen eine gesteigerte Apoptoserate erzielt werden.

Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Selenkonzentration von 400µg/l im Zusammenhang mit Bestrahlung die Apoptoserate erhöht. Bisherige Studien, wie unter anderem Sanmartin et al. (Sanmartin et al., 2008) zeigten aber bereits, dass eine Dosis von 350–700 µg/d Selen als toxisch einzustufen ist. Forceville et al. (Forceville et al., 2007) gaben eine Höchstdosis von Selen mit 400µg/d an, um schädlichen Einflüssen von Selen entgegenzuwirken und beschrieben eine Selendosis von 800µg/d als toxisch. Bei bereits bestehendem oxidativem Stress, sollte laut Forceville et al. eine Dosis über 700µg/d absolut vermieden werden (Forceville et al., 2007).

Dieser toxische Effekt kann auch auf die Brustkrebszellen zutreffen. Hier konnte ein Anstieg der Apoptose unter Bestrahlung durch die Erhöhung der Selendosis erreicht werden. Die toxische Wirkung von 400µg/l Selen scheint also auch für die Brustkrebszellen in der Apoptose eine entscheidende Rolle zu spielen.

In der Behandlung des Rektumkarzinoms mit Radiochemotherapie, konnte durch die Zugabe von 400µg/l Selen bei Bestrahlung ein Schutz des Normalgewebes erreicht und dadurch die Lebensqualität der Patienten verbessert werden (Hehr et al., 1997). Die Behandlung mit 400µg/l Selen könnte somit auch in der Behandlung des Mammakarzinoms zwei positive Eigenschaften aufweisen: zum einen die Reduktion des Tumorgewebes und zum anderen die Protektion des Normalgewebes. Dieser Aspekt ist besonders wichtig für zukünftige Studienansätze an *in-vivo* Modellen. Auch der bereits genannte verstärkende Effekt von p-53 durch Selen zeigt viel Potential für weiterführende Studien, da eine Beeinflussung von p-53 durch Selen an Brustkrebszellen bisher noch kaum erforscht ist.

In den Zelllinien T47D und MCF7 wurden keine statistischen Signifikanzen erreicht.

Der zweite Apoptosetest, die Caspase 3 Färbung, führte zu eindeutigeren Ergebnissen, welche mit der aktuellen Literatur über *in-vitro* Versuche an humanen Fibroblasten und Plattenepithelzellen weitgehend übereinstimmen (Rodemann et al., 1999, Schleicher et al., 1999).

Bei der Betrachtung der Apoptosehäufigkeit mit dem Caspase 3 Test, zeigte sich ein Anstieg der apoptotischen Zellen nach Bestrahlung bei allen drei getesteten Zelllinien. Bei der Zelllinie MCF7 war dieser Anstieg nur als steigender Trend ($p=0,08$) zu verzeichnen, während bei den Zelllinien MDA-MB231 ($p=0,05$) und T47D ($p=0,00$) ein signifikanter Anstieg deutlich wurde.

Bei der alleinigen Behandlung der Tumorzellen mit Selen ohne jeglichen Bestrahlungseffekt, konnte lediglich in der Zelllinie MCF7 bei der Zugabe von $140\mu\text{g/l}$ Selen ($p=0,01$) und $400\mu\text{g/l}$ Selen ($p=0,07$) eine verstärkte Apoptose gefunden werden.

Dies zeigt, dass durch die Substitution von höheren Dosen Selen und deren direktem zytotoxischen Effekt auf die Zellen, eine Hemmung des Karzinomwachstums in der Zelllinie MCF7 erreicht werden kann. Dieser neu gewonnene Aspekt könnte für die Therapie bedeuten, dass eine Substitution höherer Dosen Selen ohne Bestrahlung sinnvoll ist, vorausgesetzt Tumorzellen reagieren empfindlicher auf hohe Selendosen als Normalgewebszellen. Damit wäre es möglich bei nicht mehr bestrahlungsfähigen Tumoren, höhere Dosierungen von Selen zu verwenden, um dadurch eine Stagnation bzw. ein verzögertes Wachstum des Tumorgewebes zu erreichen. Diese Erkenntnis, auf der Basis der hier dargelegten Ergebnisse, ist eine sehr interessante Grundlage für weitere *in-vivo* Experimente und besonders für die Behandlung von Palliativpatienten von Bedeutung.

Bei der Betrachtung der bestrahlten Zellen unter Seleneinfluss, konnte in der Zelllinie T47D durch die Zugabe von $140\mu\text{g/l}$ Selen eine signifikante Änderung und damit ein Anstieg der Apoptose beobachtet werden ($p=0,04$).

Der Seleneinfluss auf bestrahlte Brustkrebszellen ist zum momentanen Zeitpunkt noch nicht ausreichend anhand von Studien untersucht. Somit existieren bisher kaum Arbeiten über das Apoptosegeschehen unter Seleneinfluss kombiniert mit Bestrahlungseffekten.

Vadgama et al. beschrieben jedoch bereits im Jahr 2000 eine verstärkte Apoptoserate durch den Zusatz von Selen unter der Behandlung von Taxol oder Doxorubicin an MCF7 Brustkrebszellen (Vadgama et al., 2000). Darüber hinaus konnte auch beim Einsatz von Cisplatin und Selen in Tiermodellversuchen das Tumorstadium deutlich gehemmt und dadurch ein besserer Effekt der Behandlung erzielt werden (Frenkel and Caffrey, 2001).

Im Vergleich von unbestrahlten und mit Selen behandelten Proben miteinander, konnte gezeigt werden, dass in der Zelllinie MCF7 jeweils durch die höhere Selendosis eine signifikante Steigerung der Apoptose möglich war. Diese zeigte sich bei der Zugabe von $140\mu\text{g/l}$ Selen als stark signifikant ($p=0,01$), wohingegen bei der Zugabe von $400\mu\text{g/l}$ lediglich ein Trend zu erkennen war ($p=0,07$ bei 70Selen_0Gy/400Selen_0Gy und $p=0,09$ bei 140Selen_0Gy/400Selen_0Gy).

Bei der Betrachtung der bestrahlten und Selen behandelten Proben untereinander, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Bezogen auf die Apoptose, konnten höhere Selendosen unter ionisierender Bestrahlung damit zu einer Beeinflussung der Mammakarzinomzellen führen. Bei der Zugabe von 70µg/l Selen kam es zu keiner relevanten Veränderung der Apoptose, wohingegen bei der Betrachtung von 140µg/l Selen ein verstärkter apoptotischer Zelluntergang zu erreichen war.

Für den therapeutischen Ansatz würde das bedeuten, dass lediglich höhere Selenkonzentrationen während der Bestrahlung zu einer Steigerung der Apoptoserate und damit zu einem Tumorregress führen könnten. Diese Erkenntnis stützt die Hypothese, dass Selen durch den direkten zytotoxischen Einfluss auf die Zellen, den Strahleneffekt einer Brustkrebstherapie beeinflussen kann und durch Steigerung der Apoptose eine Reduktion der Tumormasse zu erzielen ist. Für weiterführende Studien sind jedoch notwendigerweise Mausmodellversuche durchzuführen.

Der zweite Versuchsteil dieser Arbeit befasste sich ebenfalls mit einem wichtigen Endpunkt in der Strahlentherapieforchung. Verwendet wurde die γ H2AX Methode, welche die Induktion und Reparatur von DNS Doppelstrangbrüchen nach Bestrahlung im Zusammenhang mit verschiedenen Selenkonzentrationen untersucht. Dazu wurden die Anzahl der DNS-Doppelstrangbrüche durch die Messung der Foci-Häufigkeit, 24 Stunden nach Bestrahlung, gemessen.

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, entstehen durch den Einfluss von ionisierender Strahlung sogenannte ROS, welche Basenschäden, Einzelstrang- und Doppelstrangbrüche in der DNS bewirken. Im Folgenden wurde nun der Einfluss von Selen als Radikalfänger auf die Anzahl der nicht reparierten Doppelstrangbrüche in den bestrahlten Zellen nach 24 Stunden diskutiert.

Im gesunden Gewebe, kann durch die Zugabe von Selen ein gewisser Schutz vor oxidativem Stress hervorgerufen und damit DNS-Schäden vermindert werden. Dies wurde bereits an einer Studie von 2004 deutlich. In dieser Arbeit konnte durch die Zugabe von Selen ein Rückgang des DNS-Schadens an hepatozellulären Proben im Mausmodell beobachtet werden (Yu and Chen, 2004).

Für die Versuchsreihe dieser Arbeit konnten nur die Zelllinien MCF7, sowie MDA-MB231 verwendet werden. Eine Beurteilung der DNS-Doppelstrangbruchhäufigkeit der Zelllinie T47D war trotz mehrmaliger Versuchsdurchführung wegen einer sehr hohen γ H2AX-Hintergrundfluoreszenz nicht möglich. Dieses Problem wurde bereits 2006 von Yu et al. (Yu et al., 2006) beschrieben. Dabei beeinflusste die sehr hohe γ H2AX-Hintergrundfluoreszenz die Detektion der nach längerer Zeit noch nicht reparierten DNS-Schäden.

Die Zelllinien MCF7 und MDA-MB231 zeigten, bei alleiniger Bestrahlung ohne Seleneinfluss, signifikant erhöhte Anzahlen an nicht reparierten Doppelstrangbrüchen. Bei der Zelllinie MCF7 war dieser nur als Trend ($p= 0,09$), bei der Zelllinie MDA-MB231 signifikant ($p= 0,01$) ausgeprägt.

Dies ist in Einklang zu bringen mit früheren Studien, in welchen der alleinige Bestrahlungseffekt zu einem verstärkten DNS-Schaden führte.

Djuzenova et al. beschrieben 2013 die Bestrahlungssensibilität von peripheren mononuklearen Blutzellen, welche aus Brustkrebspatienten isoliert wurden. Hier konnte eine Zunahme der Foci-Häufigkeit mittels γ H2AX und 53BP1 erkannt werden (Djuzenova et al., 2013). In einer Studie von He et al. wurde die γ H2AX- Methode zur Quantifizierung von Lungenkrebspatienten eingesetzt, die ebenfalls eine erhöhte Focirate nach Bestrahlung zeigte (He et al., 2013b).

Bei der Betrachtung der DNS-Doppelstrangbruchhäufigkeit von in dieser Arbeit zugrunde liegenden Brustkrebszelllinien, 24 Stunden nach Bestrahlung, konnten einige interessante Ergebnisse durch den Zusatz von Selen erzielt werden.

In der Behandlung der unbestrahlten Zellen, welche mit Selen behandelt wurden, konnte in der Zelllinie MDA-MB231 durch die Zugabe von 400 μ g/l Selen ein signifikanter Effekt erreicht werden ($p=0,02$). Hier kam es durch den Einsatz von 400 μ g/l Selen zu einem Anstieg der DNS-Doppelstrangbruchhäufigkeit. Ähnlich wie bei der Apoptose, besteht die Möglichkeit durch den Einsatz von 400 μ g/l Selen, dass eine toxische Wirkung zum Tragen kommt, welche die Reparaturfähigkeit der Krebszellen nach 24 Stunden vermindert und dadurch vermehrt Foci sichtbar werden. Somit könnten hohe Selenkonzentrationen alleine bereits zu einer Schädigung der DNS führen.

Im Vergleich der unterschiedlich konzentrierten Selendosen der unbestrahlten Zellen miteinander konnte ebenfalls eine Erhöhung der Foci-Häufigkeit bei der Zugabe von 400 μ g/l Selen in beiden Zelllinien beobachtet werden. Bei der Zelllinie MCF7 konnte eine Tendenz erkannt werden ($p=0,07$) und in der Zelllinie MDA-MB231 zeigten sich deutlich signifikante Ergebnisse (70Selen_0Gy/400Selen_0Gy $p= 0,03$, 140 Selen_0 Gy/400 Selen_0 Gy $p=0,01$). Auch hier wurde der toxische Effekt von 400 μ g/l Selen sichtbar, welcher zu einer vermehrten DNS-Doppelstrangbruchhäufigkeit führte.

Bei der Substitution der bestrahlten Zellen mit Selen, wurde in keiner der Zelllinien ein signifikanter Effekt auf die DNS-Doppelstrangbruchhäufigkeit sichtbar. Auch im Vergleich der bestrahlten und selensubstituierten Proben miteinander, konnte kein direkter zytotoxischer Effekt von Selen auf die Zellen erkannt werden.

Die Daten zeigen, dass Selen die Doppelstrangbruchinduktion bzw. -reparatur bei einer Brustkrebsbehandlung weder positiv noch negativ beeinflusst. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die positiven Eigenschaften von Selen auf das Normalgewebe genutzt werden können um oxidativen Stress zu reduzieren, ohne dass eine zusätzliche Protektion des Tumorgewebes zu erwarten ist. Allerdings müsste man hierzu Vergleiche zwischen Normalgewebs- und Tumorzellen durchführen.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wurde in einer Studie von Franca et al. (Franca et al., 2011) der Selenspiegel im Vollblut von Mammakarzinompatientinnen vor und nach der Behandlung mit Strahlentherapie gemessen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass der Selenspiegel durch die Behandlung absank, was den erhöhten Selenbedarf bei Mammakarzinompatienten unter Radiotherapie bestätigte (Franca et al., 2011). Aber auch ohne Strahlentherapie konnte bei BRCA 1 Mutationsträgerinnen ein erniedrigter Selenspiegel nachgewiesen werden. Hier konnte durch die Supplementierung von Selen ein Rückgang der Chromosomenstrangbruchhäufigkeit erreicht werden (Kowalska et al., 2005). Zusätzlich konnte eine Hemmung der Angiogenese und des Wachstumsfaktors VEGF im Tumorgewebe durch Selensubstitution belegt werden (Jiang et al., 1999). Diese Studien bestärken damit den substituierenden Effekt von Selen in der Behandlung des Mammakarzinoms.

Alle diese aufgeführten positiven Wirkungen von Selen auf Mammakarzinomzellen haben keine Auswirkungen auf die DNS-Doppelstrangbruchhäufigkeit bzw. DNS-Doppelstrangbruchreparatur der Tumorzellen. Um die Ergebnisse jedoch noch zu bekräftigen, müssen auch hier *in-vivo* Studien durchgeführt werden.

Der dritte untersuchte Endpunkt, das klonogene Zellüberleben, ist der Goldstandard in der Strahlentherapieforchung, um die Sensibilität der Tumorzellen gegenüber ionisierender Strahlung zu messen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Korrelation zwischen der Überlebensfraktion der Zelllinien und den Selendosen untersucht.

Shin et al. (Shin et al., 2007) stellten 2007 eine Arbeit vor, welche sich mit dem Zusammenhang von Selen und Bestrahlung an Lungenkrebszellen beschäftigte. Hier wurden zwei verschiedene Lungenkrebszelllinien und Fibroblasten der Lunge verwendet und mittels Koloniebildung untersucht. Durch die Kombination von Selen mit ionisierender Strahlung konnte hier eine verminderte Überlebensfraktion der Krebszellen gesichert werden. Die Fibroblasten als Repräsentanten des Normalgewebes zeigten keinen Effekt.

Die Ergebnisse des Koloniebildungstests dieser Arbeit zeigten, dass ein erhöhtes klonogenes Zellüberleben ohne Bestrahlung in den Zelllinien MCF7 und MDA-MB231 bei der niedrigen (70µg/l) Selenkonzentration erreicht werden konnte und somit ein Schutz der Zellen entstand. Die Zugabe von 140µg/l und 400µg/l Selen führte hier zu keinem signifikanten Ergebnis. 70µg/l Selen pro Tag kann somit Mammakarzinomzellen schützen.

Diese Daten zeigen, dass durch den Einsatz von Selen zwar ein antioxidativer Schutz des Normalgewebes gewährleistet wird, aber zusätzlich auch ein Schutz des Tumorgewebes entstehen kann. Die hier aufgeführten Ergebnisse sind jedoch nur ein erster Schritt in der Forschung bezogen auf die Wirksamkeit von Selen auf Mammakarzinomzellen. Da sich die Studien dieser Arbeit jedoch auf *in-vitro* Versuche beschränken, sind zukünftig auch *in-vivo* Versuche notwendig, um einen tumorprotektiven Schutz von Selen in niedriger Dosierung zu überprüfen.

Bei der Betrachtung des klonogenen Zellüberlebens der bestrahlten Zellen, konnte in der Zelllinie MCF7 bei 4Gy ein signifikanter Seleneinfluss gesehen werden. Die Zugabe von 70µg/l Selen bzw. 400µg/l Selen führten zu einer Verbesserung des Zellüberlebens und zeigten damit einen schützenden Effekt. In der Arbeit von Shin et al. (Shin et al., 2007) wurden Selenkonzentrationen von 0µg/l, 50µg/l, 100µg/l und 200µg/l Selen verwendet. Die Ergebnisse zeigten keine verminderte Überlebensfraktion bei niedriger Selenkonzentration und decken sich somit nicht mit der vorliegenden Arbeit.

Bei der Behandlung der Mammakarzinomzellen mit 400µg/l Selen zeigte der Koloniebildungstest in dieser Arbeit eine entgegengesetzte Tendenz, als bei den Endpunkten der Apoptose und DNS-Doppelstrangbruchhäufigkeit. Hier führte die Substitution der hohen Selenkonzentration zu einer Protektion der Tumorzellen, wohingegen in den anderen beiden Endpunkten die gleiche Dosierung vielmehr als toxisch einzustufen war.

Der α/β -Quotient, welcher das Verhältnis aus linearem und quadratischem Parameter beschreibt und für das Reparaturvermögen der Zellen steht, zeigte in allen drei Zelllinien Veränderungen, welche nachfolgend beschrieben werden. Je ausgeprägter die Schulter in der Überlebenskurve ist, also je mehr die quadratische Komponente überwiegt, desto kleiner ist auch das α/β -Verhältnis und desto größer ist das Reparaturvermögen der untersuchten Zellen.

70µg/l Selen führte zu einer Senkung des α/β -Quotienten (MCF7: von 3,81 auf 1,01, MDA-MB231: von 2,73 auf 0,67, T47D: von 74,45 auf 40,03), was mit einem verbesserten Reparaturvermögen der Zelllinien MCF7, MDA-MB231 und T47D einhergeht. Auch eine Zugabe von 140µg/l Selen führte in den Zelllinien MCF7 und T47D zu einem niedrigeren α/β -Verhältnis und damit zu einem verbesserten Reparaturvermögen. Hier wurden die Tumorzellen durch die Selensubstitution geschützt.

Dieses Ergebnis muss sehr kritisch gesehen werden in der Behandlung von Brustkrebs mit Strahlentherapie. Wenn Patientinnen während ihrer Bestrahlungstherapie mit zusätzlichen Selendosen behandelt werden, könnte dadurch der Bestrahlungseffekt beeinträchtigt und eine Tumorregression verzögert werden. Es könnte sogar zu einem gesteigerten Tumorprogress kommen. Falls dieser Aspekt auch in in-vivo Mausmodellen bekräftigt werden kann, so muss in naher Zukunft von einer Selensubstitution während der Strahlentherapie abgeraten werden.

In der Zelllinie MDA-MB231 hingegen, führte eine Substitution von 140µg/l Selen zu einem höheren α/β -Verhältnis.

Dagegen führte eine Behandlung mit 400µg/l Selen in den Zelllinien MCF7 und MDA-MB231 zu einem erhöhten α/β -Verhältnis und zeigte den direkten zytotoxischen Effekt von Selen auf die Zellen. Hier bestätigte sich der Effekt der vorhergehenden Endpunktanalysen. In der Zelllinie T47D bewirkte 400µg/l Selen jedoch genau das Gegenteil und führte zu einem verstärkten Reparaturvermögen der Zellen, was möglicherweise durch die unterschiedliche Empfindlichkeit der Zellen gegenüber der Selenkonzentration zu erklären ist.

Die „radiation enhancement ratio“ zeigte in den strahlensensitiven Zelllinien MCF7 und MDA-MB231, durch die Zugabe von 70µg/l Selen, eine verbesserte Koloniebildungsfähigkeit bei 2Gy. Dagegen reagierte die resistenterere Zelllinie T47D auf den Zusatz von 70µg/l Selen mit einer verminderten Koloniebildungsfähigkeit.

Bestätigt sich der Effekt der erhöhten Zellüberlebensrate bei 2Gy und 70µg/l Selen an Mausmodellen, so muss eine zukünftige Behandlung mit Selen in der Bestrahlungstherapie von Mammakarzinomen dringend überdacht werden.

Die Zugabe von 140µg/l Selen führte lediglich bei MDA-MB231 zu einer reduzierten Koloniebildung und zu niedrigerem Zellüberleben, in den anderen beiden Zelllinien wirkte die Dosis dagegen dem Bestrahlungseffekt entgegen und führte zu höherem Zellüberleben.

Die Zugabe von 400µg/l Selen führte im Koloniebildungstest bei allen drei Zelllinien zu einer erhöhten Überlebensrate und damit zu einem Schutz der Zellen gegenüber Strahlung. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis sein, dass vor sehr hoher Selensubstitution in der Bestrahlungstherapie des Mammakarzinoms abgeraten werden sollte.

5 Zusammenfassung

Diese Doktorarbeit befasst sich mit dem Einfluß von Selen in der strahlentherapeutischen Behandlung des Mammakarzinoms. Die Fragestellung lautet, ob Selen einen positiven schützenden Effekt auf das Tumorgewebe hat und somit den Bestrahlungseffekt abmildert.

Um diesen Zusammenhang aufzuklären wurden drei verschiedene Brustkrebszelllinien, MCF7, T47D und MDA-MB231, ausgewählt. In Kombination von unterschiedlichen Selenkonzentrationen mit und ohne Bestrahlung wurde der Einfluß von Selen mittels *in-vitro* Versuchen getestet.

Dafür wurden drei verschiedene charakteristische Endpunkte untersucht: Die Apoptoserate, die DNS- Doppelstrangbruchhäufigkeit und das klonogene Zellüberleben der Tumorzellen, da diese besonders aussagekräftig sind, um eine Strahlenantwort zu quantifizieren.

Bei der Betrachtung aller drei Endpunkte konnte festgehalten werden, dass eine niedrige Selenkonzentration von 70µg/l keine negative Beeinflussung der Strahlenbehandlung bei der Messung der Apoptose und der DNS-Doppelstrangbruchhäufigkeit zur Folge hat. Im Koloniebildungstest hingegen, dem Goldstandard in der Strahlenbiologie, wirkte die niedrige Selendosis von 70µg/l der Strahlenbehandlung entgegen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Selen den Strahleneffekt in Bezug auf die Apoptose und DNS-Doppelstrangbruchhäufigkeit nicht negativ beeinflussen und eine Substitution unbedenklich erscheinen lässt. Die Ergebnisse des klonogenen Zellüberlebens zeigen jedoch, dass durch Selen auch ein schützender Effekt auf Mammakarzinomzellen möglich ist. Dies spricht wiederum gegen eine Selenzugabe während Strahlentherapie in der Karzinombehandlung.

Die höheren Selendosen (140 und 400µg/l) führten zu einer Steigerung der Apoptose, wohl durch den direkten zytotoxischen Einfluss von Selen. Die gesteigerte Apoptose steht jedoch nicht mit der DNS-Doppelstrangbruchreparatur im Zusammenhang, da die zytotoxische Wirkung des Selens keine Induktion von DNS-Doppelstrangbrüchen bewirkte. Dagegen reagierten die Tumorzellen bei den beiden höheren Konzentrationen je nach Zelllinie mit einer gesteigerten oder abgeschwächten Koloniebildungsfähigkeit beim klonogenen Zellüberleben.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von *in-vitro* Versuchen gezeigt, dass der Einsatz von höheren Selenkonzentrationen in Bezug auf die Apoptose und DNS-Doppelstrangbruchreparatur nach 24 Stunden, keinen negativen Einfluss auf die Strahlentherapie ausübt und die Schonung des Normalgewebes in der Mammakarzinombehandlung dadurch positiv beeinflusst werden könnte. Die Ergebnisse des klonogenen Zellüberlebens dagegen zeigten, dass Selen auch einen schützenden Effekt auf die Zellen ausüben kann und die Tumorkontrolle damit verschlechtert werden könnte. Diese beiden konträren Effekte erfordern weitere Forschungen an *in-vivo* Modellen, um diese Ergebnisse zu überprüfen und später einen optimalen Behandlungsplan für Mammakarzinompatienten erstellen zu können.

Um die direkte Wirkung von Selen im Biomechanismus der Zellen besser verstehen zu können, sind außerdem weitere Studien zur Erforschung der biochemischen Prozesse sinnvoll.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind aber ein wichtiger Schritt um den Einfluß von Selen auf die Strahlentherapie bei Brustkrebs zu erforschen. Die Arbeit zeigt einen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem Einfluss von Selen auf den Bestrahlungseffekt bei Mammakarzinomzelllinien. Diese Ergebnisse dienen als Grundlage für weitere Studien um den Einsatz von Selen in der Brustkrebstherapie in der Zukunft zu optimieren.

6 Danksagung

Ein herzliches Dankeschön möchte ich Frau Prof. Dr. med. S. E. Combs, Herrn PD Dr. T.E. Schmid, Frau Prof. Dr. rer. nat. G. Multhoff, und Dr. med. Dr. medic. M. N. Duma für die Vergabe und Realisierung dieser Arbeit aussprechen.

Dem ganzen Team der experimentellen Radioonkologie, besonders Frau Dr. rer. nat. D. Schilling und Frau PhD C. Bayer und meinen Doktorandenkollegen danke ich sehr für Ihre kollegiale Zusammenarbeit und Ihre stete Unterstützung.

Hervorheben möchte ich Herrn PD Dr. T.E. Schmid, der mich in dem Prozess meiner Doktorarbeit stets begleitet und unterstützt hat.

7 Lebenslauf

Geburtsdatum: 14.10.1982
Geburtsort: Augsburg, Deutschland
Staatsbürgerschaft: deutsch
Familienstatus: ledig

Schulbildung:
1989 – 2002 Freie Waldorfschule Augsburg

Schulabschluss:
Juni 2002 Allgemeine Hochschulreife

Praktikum:
10.07.2001 – 14.07.2001 Kurzpraktikum in der gyn. Praxis
Dr.Dr.rer.Dr.nat. H. H. Warnecke in Augsburg
17.07.2001 – 21.07.2001 Kurzpraktikum auf der Entbindungsstation der
Frauen- und Kinderklinik Josefinum, Augsburg
22.10.2002 – 22.12.2002 Praktikum- Hebamme Frau Förg in Augsburg
01.01.2003 – 30.09.2003 Praktikum auf der Entbindungsstation 2 in der
Frauen- und Kinderklinik Josefinum, Augsburg

Berufsausbildung:
01.10.2003 – 01.10.2006 Berufsfachschule für Hebammen
Stenglinstraße 2
86156 Augsburg

Arbeitsverhältnis:
01.12.2006 - 30.09.2008 Hebamme im Kreißsaal des Klinikums Rechts
der Isar der Technischen Universität München

Studium:
01.10.2008 - 31.03.2011 Medizin Vorklinik an der Ludwig- Maximilians-
Universität München
31.03.2011 - 2015 Medizin Klinik an der Technische Universität
München

München, den 26. Juni 2015

Birgit Herold

AKBARALY, N. T., ARNAUD, J., HININGER-FAVIER, I., GOURLET, V., ROUSSEL, A. M. & BERR, C. 2005. Selenium and mortality in the elderly: results from the EVA study. *Clin Chem*, 51, 2117-23.

ALDRICH, S. 2013. Triton X-100. [Online im Internet:]URL: http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/t8532pis.Par.0001.File.tmp/t8532pis.pdf [Stand:24.03.2013].

ANGSTWURM, M. W., ENGELMANN, L., ZIMMERMANN, T., LEHMANN, C., SPES, C. H., ABEL, P., STRAUSS, R., MEIER-HELLMANN, A., INSEL, R., RADKE, J., SCHUTTLER, J. & GARTNER, R. 2007. Selenium in Intensive Care (SIC): results of a prospective randomized, placebo-controlled, multiple-center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock. *Crit Care Med*, 35, 118-26.

BECK, M. A., NELSON, H. K., SHI, Q., VAN DAEL, P., SCHIFFRIN, E. J., BLUM, S., BARCLAY, D. & LEVANDER, O. A. 2001. Selenium deficiency increases the pathology of an influenza virus infection. *FASEB J*, 15, 1481-3.

BERGER, M. M., BAINES, M., RAFFOUL, W., BENATHAN, M., CHIOLERO, R. L., REEVES, C., REVELLY, J. P., CAYEUX, M. C., SENECHAUD, I. & SHENKIN, A. 2007. Trace element supplementation after major burns modulates antioxidant status and clinical course by way of increased tissue trace element concentrations. *Am J Clin Nutr*, 85, 1293-300.

BLEYS, J., NAVAS-ACIEN, A. & GUALLAR, E. 2008. Serum selenium levels and all-cause, cancer, and cardiovascular mortality among US adults. *Arch Intern Med*, 168, 404-10.

BOREK, C. 2004. Antioxidants and radiation therapy. *J Nutr*, 134, 3207S-3209S.

BROOME, C. S., MCARDLE, F., KYLE, J. A., ANDREWS, F., LOWE, N. M., HART, C. A., ARTHUR, J. R. & JACKSON, M. J. 2004. An increase in selenium intake improves immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status. *Am J Clin Nutr*, 80, 154-62.

BROZMANOVA, J., MANIKOVA, D., VLCKOVA, V. & CHOVANEC, M. 2010. Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. *Arch Toxicol*, 84, 919-38.

BUNTZEL, J., MICKE, O., KISTERS, K., BRUNS, F., GLATZEL, M., SCHONEKAES, K., KUNDT, G., SCHAFFER, U. & MUCKE, R. 2010. Selenium substitution during radiotherapy of solid tumours - laboratory data from two observation studies in gynaecological and head and neck cancer patients. *Anticancer Res*, 30, 1783-6.

BURK, R. F. & HILL, K. E. 2009. Selenoprotein P-expression, functions, and roles in mammals. *Biochim Biophys Acta*, 1790, 1441-7.

C.W.ELSTON, I. O. E. 1991 Pathological prognostic factors in breast cancer. *Histopathology* 1991. 19, 403-410, Department of Histopathology, City Hospital, Nottingham, UK, May 1991

CAFFREY, P. B. & FRENKEL, G. D. 2000. Selenium compounds prevent the induction of drug resistance by cisplatin in human ovarian tumor xenografts in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol*, 46, 74-8.

- COMBS, G. F., JR. 1999. Chemopreventive mechanisms of selenium. *Med Klin (Munich)*, 94 Suppl 3, 18-24.
- CURADO, M. P. 2011. Breast cancer in the world: incidence and mortality. *Salud Publica Mex*, 53, 372-84.
- DIAMOND, A. M., DALE, P., MURRAY, J. L. & GRDINA, D. J. 1996. The inhibition of radiation-induced mutagenesis by the combined effects of selenium and the aminothiols WR-1065. *Mutat Res*, 356, 147-54.
- DJUZENOVA, C. S., ELSNER, I., KATZER, A., WORSCHKECH, E., DISTEL, L. V., FLENTJE, M. & POLAT, B. 2013. Radiosensitivity in breast cancer assessed by the histone gamma-H2AX and 53BP1 foci. *Radiat Oncol*, 8, 98.
- DONALD L. ST. GERMAIN, G. V., HERNANDEZ A 2009. Defining the Roles of the Iodothyronine Deiodinases: Current Concepts and Challenges. *Endocrinology*
- DZIAMAN, T., HUZARSKI, T., GACKOWSKI, D., ROZALSKI, R., SIOMEK, A., SZPILA, A., GUZ, J., LUBINSKI, J., WASOWICZ, W., ROSZKOWSKI, K. & OLINSKI, R. 2009. Selenium supplementation reduced oxidative DNA damage in adnexectomized BRCA1 mutations carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18, 2923-8.
- ERNÄHRUNG, D. G. F. 2013. Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung zur nutritiven täglichen Selenaufnahme. [Online im Internet:] URL:<http://www.dge.de/wissenschaft/weitere-publikationen/fachinformationen/selen-und-herz-kreislauf-krankheiten/>[Stand 01.08.2013].
- FAIRWEATHER-TAIT, S. J., BAO, Y., BROADLEY, M. R., COLLINGS, R., FORD, D., HESKETH, J. E. & HURST, R. 2011. Selenium in human health and disease. *Antioxid Redox Signal*, 14, 1337-83.
- FALBE J, R. M. 1992. *Römpf-Chemie-Lexikon*, Stuttgart, New York.
- FERNANDEZ, L. P., MILNE, R. L., BARROSO, E., CUADROS, M., ARIAS, J. I., RUIBAL, A., BENITEZ, J. & RIBAS, G. 2006. Estrogen and progesterone receptor gene polymorphisms and sporadic breast cancer risk: a Spanish case-control study. *Int J Cancer*, 119, 467-71.
- FISCHER, J. L., MIHELIC, E. M., POLLOK, K. E. & SMITH, M. L. 2007. Chemotherapeutic selectivity conferred by selenium: a role for p53-dependent DNA repair. *Mol Cancer Ther*, 6, 355-61.
- FORCEVILLE, X., LAVIOLLE, B., ANNANE, D., VITOUX, D., BLEICHNER, G., KORACH, J. M., CANTAIS, E., GEORGES, H., SOUBIROU, J. L., COMBES, A. & BELLISSANT, E. 2007. Effects of high doses of selenium, as sodium selenite, in septic shock: a placebo-controlled, randomized, double-blind, phase II study. *Crit Care*, 11, R73.
- FRANCA, C. A., NOGUEIRA, C. R., RAMALHO, A., CARVALHO, A. C., VIEIRA, S. L. & PENNA, A. B. 2011. Serum levels of selenium in patients with breast cancer before and after treatment of external beam radiotherapy. *Ann Oncol*, 22, 1109-12.

FRANKEN, N. A., RODERMOND, H. M., STAP, J., HAVEMAN, J. & VAN BREE, C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, 1, 2315-9.

FRENKEL, G. D. & CAFFREY, P. B. 2001. A prevention strategy for circumventing drug resistance in cancer chemotherapy. *Curr Pharm Des*, 7, 1595-614.

G. W. KAUFFMANN, E. M., R. SAUTER 2006. Radiologie. Elsevier GmbH, Urban und Fischer München, 3. Auflage.

G.S. 2006. Selen in der Umweltmedizin Mitteilung der Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“. Springer Medizin Verlag 2.

GALLARDO BOLANOS, J. M., MIRO MORAN, A., BALAO DA SILVA, C. M., MORILLO RODRIGUEZ, A., PLAZA DAVILA, M., APARICIO, I. M., TAPIA, J. A., ORTEGA FERRUSOLA, C. & PENA, F. J. 2012. Autophagy and apoptosis have a role in the survival or death of stallion spermatozoa during conservation in refrigeration. *PLoS One*, 7, e30688.

GARTNER, R. & ANGSTWURM, M. 1999. [Significance of selenium in intensive care medicine. Clinical studies of patients with SIRS/sepsis syndrome]. *Med Klin (Munich)*, 94 Suppl 3, 54-7.

GLADYSHEV, V. N. & HATFIELD, D. L. 1999. Selenocysteine-containing proteins in mammals. *J Biomed Sci*, 6, 151-60.

GOEL, A., FUERST, F., HOTCHKISS, E. & BOLAND, C. R. 2006. Selenomethionine induces p53 mediated cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 5, 529-35.

GONZALEZ-MORENO, O., SEGURA, V., SERRANO, D., NGUEWA, P., DE LAS RIVAS, J. & CALVO, A. 2007. Methylseleninic acid enhances the effect of etoposide to inhibit prostate cancer growth in vivo. *Int J Cancer*, 121, 1197-204.

GUDKOV, A. V. 2002. Converting p53 from a killer into a healer. *Nat Med*, 8, 1196-8.

H.J.G.BLOOM, W. W. R. 1957. Histological grading and prognosis in breast cancer. Meyerstein Institute of Radiotherapy and the Bland-Sutton Institute of Pathology of the Middlesex Hospital, London, W.1.

HATFIELD, D. L. & GLADYSHEV, V. N. 2002. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol*, 22, 3565-76.

HE, P., ZHANG, D., LI, H., YANG, X., LI, D., ZHAI, Y., MA, L. & FENG, G. 2013a. Hepatitis B virus X protein modulates apoptosis in human renal proximal tubular epithelial cells by activating the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Int J Mol Med*.

HE, Y., GONG, Y., LIN, J., CHANG, D. W., GU, J., ROTH, J. A. & WU, X. 2013b. Ionizing radiation-induced gamma-H2AX activity in whole blood culture and the risk of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 22, 443-51.

HEHR, T., HOFFMANN, W. & BAMBERG, M. 1997. [Role of sodium selenite as an adjuvant in radiotherapy of rectal carcinoma]. *Med Klin (Munich)*, 92 Suppl 3, 48-9.

HORWITZ, K. B., KOSEKI, Y. & MCGUIRE, W. L. 1978. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: role of estradiol and antiestrogen. *Endocrinology*, 103, 1742-51.

HUANG, Y., HE, L., LIU, W., FAN, C., ZHENG, W., WONG, Y. S. & CHEN, T. 2013. Selective cellular uptake and induction of apoptosis of cancer-targeted selenium nanoparticles. *Biomaterials*, 34, 7106-16.

HUANG, Z., ROSE, A. H. & HOFFMANN, P. R. 2012. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 16, 705-43.

INC., C. B. 2009-2011. MDA-MB 231/GFP Cell Line. [Online im Internet:]URL: <http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/AKR-201-gfp-mds-231-cell-line.pdf> [Stand: 15.03.2013].

INC., C. B. 2010-2011. T47D/GFP Cell Line. [Online im Internet:]URL: <http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/AKR-208-gfp-t47d-cell-line.pdf> [Stand: 15.03.2013].

INC., C. B. 2010-2012. MCF7/GFP Cell Line [Online].

JAN OLOF STRÖMBECK, F. E. R. 1987. *Mammachirurgie-Diagnostik und Behandlung von Erkrankungen der Mamma*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.

JIANG, C., JIANG, W., IP, C., GANTHER, H. & LU, J. 1999. Selenium-induced inhibition of angiogenesis in mammary cancer at chemopreventive levels of intake. *Mol Carcinog*, 26, 213-25.

JIANG, W., JIANG, C., PEI, H., WANG, L., ZHANG, J., HU, H. & LU, J. 2009. In vivo molecular mediators of cancer growth suppression and apoptosis by selenium in mammary and prostate models: lack of involvement of gadd genes. *Mol Cancer Ther*, 8, 682-91.

JOACHIM RASSOW, K. H., ROLAND NETZKER, RAINER DEUTZMANN Stuttgart, Juli 2008. *Biochemie*. Georg Thieme Verlag KG, 2.Auflage.

JULIGER, S., GOENAGA-INFANTE, H., LISTER, T. A., FITZGIBBON, J. & JOEL, S. P. 2007. Chemosensitization of B-cell lymphomas by methylseleninic acid involves nuclear factor-kappaB inhibition and the rapid generation of other selenium species. *Cancer Res*, 67, 10984-92.

KIECHLE 2011. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Elsevier GmbH, Urban und Fischer München, 2. Auflage.

KOHRLE, J., JAKOB, F., CONTEMPRE, B. & DUMONT, J. E. 2005. Selenium, the thyroid, and the endocrine system. *Endocr Rev*, 26, 944-84.

- KOLSTEREN, P. 1992. Kashin-Beck disease. *Ann Soc Belg Med Trop*, 72, 81-91.
- KOWALSKA, E., NAROD, S. A., HUZARSKI, T., ZAJACZEK, S., HUZARSKA, J., GORSKI, B. & LUBINSKI, J. 2005. Increased rates of chromosome breakage in BRCA1 carriers are normalized by oral selenium supplementation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14, 1302-6.
- LARSSON, C. L. & JOHANSSON, G. K. 2002. Dietary intake and nutritional status of young vegans and omnivores in Sweden. *Am J Clin Nutr*, 76, 100-6.
- LAST, K., MAHARAJ, L., PERRY, J., STRAUSS, S., FITZGIBBON, J., LISTER, T. A. & JOEL, S. 2006. The activity of methylated and non-methylated selenium species in lymphoma cell lines and primary tumours. *Ann Oncol*, 17, 773-9.
- LAST, K. W., CORNELIUS, V., DELVES, T., SIENIAWSKA, C., FITZGIBBON, J., NORTON, A., AMESS, J., WILSON, A., ROHATINER, A. Z. & LISTER, T. A. 2003. Presentation serum selenium predicts for overall survival, dose delivery, and first treatment response in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, 21, 2335-41.
- LEE, K. H. & JEONG, D. 2012. Bimodal actions of selenium essential for antioxidant and toxic pro-oxidant activities: the selenium paradox (Review). *Mol Med Rep*, 5, 299-304.
- LI, Z., CARRIER, L. & ROWAN, B. G. 2008. Methylseleninic acid synergizes with tamoxifen to induce caspase-mediated apoptosis in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 7, 3056-63.
- LIU, Y., CHIBA, M., INABA, Y. & KONDO, M. 2002. [Keshan disease--a review from the aspect of history and etiology]. *Nihon Eiseigaku Zasshi*, 56, 641-8.
- LIYING GUAN, F. H., ZHUSHI LI, BINGSHE HAN, QIAN JIANG, YUN REN, YANG YANG & CAIMIN XU* P53 transcription-independent activity mediates selenite-induced acute promyelocytic leukemia NB4 cell apoptosis. *BMB Rep*.2008 Oct 31.
- LOPEZ-SAEZ, J. B., SENRA-VARELA, A. & POUSA-ESTEVEZ, L. 2003. Selenium in breast cancer. *Oncology*, 64, 227-31.
- MAIA, A. L., GOEMANN, I. M., MEYER, E. L. & WAJNER, S. M. 2011. Deiodinases: the balance of thyroid hormone: type 1 iodothyronine deiodinase in human physiology and disease. *J Endocrinol*, 209, 283-97.
- MAZUMDER, S., PLESCA, D. & ALMASAN, A. 2008. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Methods Mol Biol*, 414, 13-21.
- OLDFIELD, J. E. 2002. A brief history of selenium research: From alkali disease to prostate cancer (from poison to prevention). American Society of Animal Science, Oregon State University, Corvallis 97331.
- OSTER, O. 1992. Zum Selenstatus in der Bundesrepublik Deutschland. Oster. Jena: Universitätsverlag Jena GmbH

PAPP, L. V., LU, J., HOLMGREN, A. & KHANNA, K. K. 2007. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal*, 9, 775-806.

PAWLOWICZ, Z., ZACHARA, B. A., TRAFIKOWSKA, U., MACIAG, A., MARCHALUK, E. & NOWICKI, A. 1991. Blood selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in patients with breast cancer and with advanced gastrointestinal cancer. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis*, 5, 275-7.

PROMEGA 2013. Apoptosis. [Online im Internet:]URL: <http://www.promega.com/~media/files/resources/paguide/letter/chap3.pdf?la=en> [Stand: 10.09.2013].

RAYMAN, M. P. 2005. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc Nutr Soc*, 64, 527-42.

REEVES, M. A. & HOFFMANN, P. R. 2009. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell Mol Life Sci*, 66, 2457-78.

RODEMANN, H. P., HEHR, T. & BAMBERG, M. 1999. [Relevance of the radioprotective effect of sodium selenite]. *Med Klin (Munich)*, 94 Suppl 3, 39-41.

ROGAKOU, E. P., PILCH, D. R., ORR, A. H., IVANOVA, V. S. & BONNER, W. M. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 273, 5858-68.

ROTHKAMM, K. & LOBRICH, M. 2003. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 5057-62.

SALONEN, J. T., SALONEN, R., LAPPETELAINEN, R., MAENPAA, P. H., ALFTHAN, G. & PUSKA, P. 1985. Risk of cancer in relation to serum concentrations of selenium and vitamins A and E: matched case-control analysis of prospective data. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 290, 417-20.

SANMARTIN, C., PLANO, D. & PALOP, J. A. 2008. Selenium compounds and apoptotic modulation: a new perspective in cancer therapy. *Mini Rev Med Chem*, 8, 1020-31.

SCHLEICHER, U. M., LOPEZ COTARELO, C., ANDREOPOULOS, D., HANDT, S. & AMMON, J. 1999. [Radioprotection of human endothelial cells by sodium selenite]. *Med Klin (Munich)*, 94 Suppl 3, 35-8.

SCHNABEL, R., LUBOS, E., MESSOW, C. M., SINNING, C. R., ZELLER, T., WILD, P. S., PEETZ, D., HANDY, D. E., MUNZEL, T., LOSCALZO, J., LACKNER, K. J. & BLANKENBERG, S. 2008. Selenium supplementation improves antioxidant capacity in vitro and in vivo in patients with coronary artery disease The SElenium Therapy in Coronary Artery disease Patients (SETCAP) Study. *Am Heart J*, 156, 1201 e1-11.

SCHOMBURG, L., SCHWEIZER, U., HOLTMANN, B., FLOHE, L., SENDTNER, M. & KOHRLE, J. 2003. Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem J*, 370, 397-402.

SCHUMACHER 2000. Therapie maligner Tumoren - Integration konventioneller und komplementärer Therapie

Schattauer Verlagsgesellschaft.

SEO, Y. R., KELLEY, M. R. & SMITH, M. L. 2002. Selenomethionine regulation of p53 by a ref1-dependent redox mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 14548-53.

SHIN, S. H., YOON, M. J., KIM, M., KIM, J. I., LEE, S. J., LEE, Y. S. & BAE, S. 2007. Enhanced lung cancer cell killing by the combination of selenium and ionizing radiation. *Oncol Rep*, 17, 209-16.

TSAVACHIDOU, D., MCDONNELL, T. J., WEN, S., WANG, X., VAKAR-LOPEZ, F., PISTERS, L. L., PETTAWAY, C. A., WOOD, C. G., DO, K. A., THALL, P. F., STEPHENS, C., EFSTATHIOU, E., TAYLOR, R., MENTER, D. G., TRONCOSO, P., LIPPMAN, S. M., LOGOTHETIS, C. J. & KIM, J. 2009. Selenium and vitamin E: cell type- and intervention-specific tissue effects in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 101, 306-20.

TURANOV, A. A., XU, X. M., CARLSON, B. A., YOO, M. H., GLADYSHEV, V. N. & HATFIELD, D. L. 2011. Biosynthesis of selenocysteine, the 21st amino acid in the genetic code, and a novel pathway for cysteine biosynthesis. *Adv Nutr*, 2, 122-8.

UJIIE, S., ITOH, Y. & KIKUCHI, H. 1998. [Serum selenium contents and the risk of cancer]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 25, 1891-7.

UMBERTO VERONESI, M. D., NATALE CASCINELLI, M.D., LUIGI MARIANI 2002, October 17. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, Copyright © 2002 by the Massachusetts Medical Society.

VADGAMA, J. V., WU, Y., SHEN, D., HSIA, S. & BLOCK, J. 2000. Effect of selenium in combination with Adriamycin or Taxol on several different cancer cells. *Anticancer Res*, 20, 1391-414.

VAN ENGELAND, M., NIELAND, L. J., RAMAEKERS, F. C., SCHUTTE, B. & REUTELINGSPERGER, C. P. 1998. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31, 1-9.

WALLENBERG, M., MISRA, S. & BJORNSTEDT, M. 2014. Selenium cytotoxicity in cancer. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 114, 377-86.

WASTNEY, M. E., COMBS, G. F., JR., CANFIELD, W. K., TAYLOR, P. R., PATTERSON, K. Y., HILL, A. D., MOLER, J. E. & PATTERSON, B. H. 2011. A human model of selenium that integrates metabolism from selenite and selenomethionine. *J Nutr*, 141, 708-17.

WILLIAMS, M. V., DENEKAMP, J. & FOWLER, J. F. 1985. A review of alpha/beta ratios for experimental tumors: implications for clinical studies of altered fractionation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 11, 87-96.

YEO, J. E., KIM, J. H. & KANG, S. K. 2008. Selenium attenuates ROS-mediated apoptotic cell death of injured spinal cord through prevention of mitochondria dysfunction; in vitro and in vivo study. *Cell Physiol Biochem*, 21, 225-38.

YU, R. A. & CHEN, X. M. 2004. [Effects of selenium on rat hepatocellular DNA damage, apoptosis and changes of cell cycle induced by cadmium in vivo]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, 38, 155-8.

YU, T., MACPHAIL, S. H., BANATH, J. P., KLOKOV, D. & OLIVE, P. L. 2006. Endogenous expression of phosphorylated histone H2AX in tumors in relation to DNA double-strand breaks and genomic instability. *DNA Repair (Amst)*, 5, 935-46.

ZENG, H., BOTNEN, J. H. & BRISKE-ANDERSON, M. 2010. Deoxycholic acid and selenium metabolite methylselenol exert common and distinct effects on cell cycle, apoptosis, and MAP kinase pathway in HCT116 human colon cancer cells. *Nutr Cancer*, 62, 85-92.

ZHAO, R., XIANG, N., DOMANN, F. E. & ZHONG, W. 2006. Expression of p53 enhances selenite-induced superoxide production and apoptosis in human prostate cancer cells. *Cancer Res*, 66, 2296-304.